

Yersinia enterocolitica 2/O:9 – kantojen karakterisointi MLST-menetelmällä

ELK Anu Mäkelä



Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma
Lihantarkastuksen ja teurastamohygienian oppiaine
Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osasto
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Helsingin yliopisto
2017



Tiedekunta - Fakultet - Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning - Department Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osasto
Tekijä - Författare - Author Anu Henrika Mäkelä		
Työn nimi - Arbetets titel - Title <i>Yersinia enterocolitica</i> 2/O:9 – kantojen karakterisointi MLST-menetelmällä		
Oppiaine - Läroämne - Subject Lihantarkastuksen ja teurastamohygienian oppiaine		
Työn laji - Arbetets art - Level Lisensiaatin tutkielma	Aika - Datum - Month and year	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages
Tiivistelmä - Referat – Abstract <p>Viime vuosina <i>Yersinia enterocolitica</i> bioserotyypin 2/O:9 esiintyminen on lisääntynyt Euroopassa. Bioserotyyppi 4/O:3 on pitkään ollut yleisin ihmisten yersinioosia aiheuttava kanta, mutta myös bioserotyypin 2/O:9 on todettu olevan patogeeninen ihmisille. Bioserotyypin kantoja on eristetty sioista, lampaista ja naudoista, mutta ne eivät pääosin aiheuta tautia eläimillä. Suomessa tätä bioserotyyppiä on erittäin harvoin eristetty eläimistä.</p> <p><i>Y. enterocolitica</i> tunnistus on pitkään tapahtunut pääosin bio- ja serotyyppityksen avulla. Näiden menetelmien heikkous on kuitenkin herkkyyks ympäristön vaikutuksille. Multilocus sequence typing (MLST) – menetelmän avulla bakteereita voidaan tunnistaa sekvensoimalla bakteerin ylläpitogeenejä. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli tutkia eri lähteistä peräisin olevia <i>Y. enterocolitica</i> -kantoja MLST-menetelmällä, joka perustuu seitsemään ylläpitogeeniin (Hall ym. 2015), ja tämän avulla vertailla suomalaisten ja eurooppalaisten kantojen eroavaisuuksia. Lisäksi tavoitteena oli pystyttää toimiva seitsemään ylläpitogeeniin perustuva <i>Yersinia</i> MLST-menetelmä Elintarvikehygienian- ja ympäristöterveyden osastolle.</p> <p>Yhteensä tutkittiin 10 <i>Y. enterocolitica</i> –kanta, joiden oletettiin alustavien bioserotyyppitystulosten perusteella kuuluvan biotyyppiin 2 ja serotyyppiin O:9. Suomalaiset kannat oli eristetty lampaiden (4/10), myyrän (1/10) ja ihmisen ulosteesta (1/10). Suomalaisia kantoja verrattiin Sveitsissä ja Saksassa eristettyihin kantoihin, jotka oli eristetty sian nielurisasta (1/10), villisian nielurisasta (1/10) ja ihmisen ulosteesta (2/10). Kantojen puhtaus varmistettiin veri- ja selektiivilevyllä, ja tyypitettiin kaupallisella testillä sekä bio- ja serotyyppitysmenetelmillä. MLST-menetelmää varten tutkittavien kantojen DNA eristettiin kaupallisella menetelmällä ja lisäksi DNA:n laatu ja määrä optimoitiin. Kannoista monistettiin MLST-karakterisointia varten PCR:n avulla seitsemän ylläpitogeeniä (<i>aarf</i>, <i>dff</i>, <i>galR</i>, <i>glnS</i>, <i>hemA</i>, <i>rfaE</i> ja <i>speA</i>). Ennen tutkimusta, PCR-ajo optimoitiin kaikille geeneille. Saadut PCR-tuotteet sekvensoitiin ja sekvenssejä vertailtiin <i>Yersinia</i> MLST-tietokantaan sekä aiempiin tutkittuihin sekvenssityyppeihin.</p> <p>Kaikkien suomalaisista lampaista eristettyjen kantojen MLST-sekvenssityypit muistuttivat toisiaan. Yksi ulkomaalaisista kannoista osoittautui tyypityksessä bioserotyyppiä 1A/O:5, joka näkyi myös poikkeavana MLST-sekvenssityypinä. Suomalaisesta myyrästä eristetty kanta muistutti profiililtaan lampaista eristettyjen kantojen MLST-tyyppejä. Pääosin kaikki yhdeksän bioserotyypin 2/O:9 kanta muistuttivat huomattavasti toisiaan. Eroavaisuudet olivat pääosin ihmisistä eristettyjen kantojen välillä. Myös MLST-profiilit vastasivat tietokannan O:9 -serotyypin kantoja. Seitsemästä tutkitusta geenistä geenin <i>rfaE</i> osalta emme saaneet luotettavia tuloksia. Geenin <i>galR</i> kohdalla saimme laadukasta sekvenssiä vain yhteen suuntaan sekvenssoidessa. Muiden geenien kohdalla MLST-menetelmän pystyttäminen onnistui odotetusti.</p> <p>Suomesta eläimistä eristettyjen kantojen profiilit olivat hyvin samankaltaisia, viitaten niiden olevan läheistä alkuperää. Tämä on tärkeä tekijä selvitetessä bioserotyypin leviämisreittejä Suomessa. Villieläinten on epäilty olevan bioserotyypin 2/O:9 reservuaari. Tutkimuksemme lampaiden, villisian ja myyrän samankaltaiset MLST-profiilit tukevat tätä hypoteesia edelleen. Tuloksia arvioitaessa tulee myös huomioida MLST-menetelmän mahdollinen heikko kyky erottaa geneettisesti läheisiä kantoja.</p>		
Avainsanat - Nyckelord - Keywords <i>Yersinia enterocolitica</i> , Lammas, MLST, Yersinioosi		
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto		
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktor och ledare - Director and Supervisor(s) Maria Fredriksson-Ahomaa (Johtaja) Suvi Joutsen (Ohjaaja)		

SISÄLLYS

1. JOHDANTO
2. KIRJALLISUUSKATSAUS
 - 2.1 *Yersinia enterocolitica*
 - 2.1.1. Bio- ja serotyypit
 - 2.1.2. Yersinioosi
 - 2.1.3. Tartuntatiet
 - 2.1.4. Virulenssi
 - 2.2 *Yersinia enterocolitica* 2/0:9
 - 2.2.1. Esiintyminen
 - 2.2.2. Ristireaktio *Brucella*-bakteerin kanssa
 - 2.3 MLST (multilocus sequence typing)
 - 2.3.1. Housekeeping (ylläpito) –geenit
 - 2.3.2. Sekvensointi
 - 2.3.3. MLSA
 - 2.4 *Yersinia*-kantojen MLST-sekvensointi
3. TYÖN HYPOTEESI
4. MATERIAALI
5. MENETELMÄT
 - 5.1 Kantojen kuvaus
 - 5.1.1. Kasvu selektiivialustoilla
 - 5.1.2. Tunnistus
 - 5.2 MLST
 - 5.2.1. DNA:n eristys
 - 5.2.2. Geenien monistaminen
 - 5.2.3. Sekvensointi
6. TULOKSET
7. POHDINTA
8. JOHTOPÄÄTÖKSET
9. KIITOKSET
10. LÄHDELUETTELO
11. LIITTEET

1. JOHDANTO

Yersinia enterocolitica on gramnegatiivinen sauvabakteeri, joka aiheuttaa yersinioosiksi kutsuttua suolistotulehdusta. Yersinioosi on Euroopan kolmanneksi yleisimmän raportoitu zoonoosi (EFSA & ECDC 2015), jonka oireita ovat tavallisimmin akuutti suolistotulehdus ja kuume. Bakteeri leviää useimmiten ruuansulatuskanavan kautta feko-oraalisesti.

Sikojen on todettu olevan yksi patogeenisen *Y. enterocolitica*n tärkeimmistä reservuaareista (Fredriksson-Ahomaa ym. 2001). Koska *Y. enterocolitica* on psykotrofinen, se selviää hyvin elintarviketuotannon kylmäketjusta. Kontaminoitunut sianliha voi raakana tai alikypsennettynä toimia tartuntalähteenä ihmisten yersinioosille. Myös pienmärehäntien ja seuraeläimien on havaittu kantavan *Y. enterocolitica*a (Chenais ym. 2012, Fredriksson-Ahomaa ym. 2001).

*Y. enterocolitica*n bioserotyypeistä 4/O:3 on pitkään ollut yleisin Euroopassa. Viime vuosina kuitenkin bioserotyypin 2/O:9 esiintyminen on lisääntynyt huomattavasti. Enteropatogeeninen *Y. enterocolitica* on zoonoottinen bakteeri joka ei yleensä aiheuta eläimissä oireita. Sikojen lisäksi lampaista ja naudoista on satunnaisesti eristetty enteropatogeenisiä yersinioita (Rosner ym. 2010). *Y. enterocolitica*n bioserotyypin 2/O:9 leviäminen laajasti myös lampaisiin ja nautoihin aiheuttaa riskitekijän elintarviketuotannolle näiden eläinten kohdalla.

Suomen kannalta bioserotyypin 2/O:9 leviäminen on ongelma, sillä kyseistä bakteerikantaa kantava eläin antaa usein serologisissa tutkimuksissa väärän positiivisen tuloksen *Brucella melitensis* -bakteerille johtuen bakteerien antigeenien samanlaisuudesta (Chenais ym. 2012). *Brucella*-bakteerien aiheuttama tauti bruselloosi on kansallisesti valvottu zoonoottinen eläintauti. Väärät positiiviset tulokset lisäävät valvonnan työtaakkaa. Suomi on todettu brusellavapaaksi maaksi.

Tämän tutkielman tutkimusosuuden tavoitteena oli muokata MLST-menetelmästä toimiva protokolla *Y. enterocolitica*lle Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osastolle. Lisäksi tarkoituksena oli selvittää *Y. enterocolitica*n bioserotyypin 2/O:9 sisäisen vaihtelun määrää ylläpitogeenien muodossa, vertailla Euroopasta eristettyjä kantoja ja pohtia bakteerin mahdollisia leviämistapoja Suomessa.

2. KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica on *Yersinia*-sukuun kuuluva invasiivinen suolistopatogeeni. *Yersiniat* ovat gramnegatiivisia, oksidaasinegatiivisia ja fakultatiivisesti anaerobeja sauvabakteereita (Petersen ym. 2015). *Y. enterocolitica* on yksi tärkeimmistä ihmisten suolistopatogeeniestä. Salmonelloosin ja kampylobakterioosin jälkeen yersinioosi on kolmanneksi yleisin bakteerizoonoosi Euroopassa (Rosner ym. 2010). *Yersinia*-lajeja on tunnistettu tällä hetkellä 18, joista kolmea pidetään ihmisille patogeenisena: *Y. enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* ja *Yersinia pestis* (Le Guern ym. 2016). Suolistotautia aiheuttavat *Y. enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis* leviävät pääosin saastuneiden elintarvikkeiden kautta, paiseruttoa aiheuttava *Y. pestis* puolestaan jyrsijä- ja hyönteisvektorien kautta.

Y. enterocolitica on psykotrofinen, kasvaa 0-44 °C ja kestää hyvin pakastusta (Bottone 2015). Kasvun optimilämpötila on 28–30 celsiusasteessa, jolloin generaatioaika on noin 34 min (Petersen ym. 2015). Näin ollen kantoja tutkitaan usein 20–30 celsiusasteessa. *Y. enterocolitica* liikkuu flagellan avulla 25 celsiusasteen lämpötilaan asti, mutta liikkuminen lakkaa korkeammissa lämpötiloissa. Kiinteällä kasvualustalla pesäkkeet ovat parhaimmassa vaiheessa 24 tunnin inkubaation jälkeen, jonka jälkeen muut enterobakteerit voivat vallata elintilan ja peittää *Y. enterocolitican* kasvun alleen (Bottone 2015). Koska *Y. enterocolitica* kasvaa muihin enterobakteereihin verrattuna hyvin kylmässä, voidaan erottelussa hyödyntää kylmärikastusta.

Y. enterocolitica -kannat ovat herkkiä kuumennukselle. Ne eivät lisäänny, jos NaCl-pitoisuus on yli 7 %. Bakteri on herkkä desinfektioaineille ja orgaanisille hapoille, mutta kestää hyvin emäksisiä oloja. Yersinioille optimaalinen ympäristön pH on 4-10. Bakteerin ureaasin tuotto kuitenkin parantaa happamissa oloissa selviämistä (Bottone 2015).

Y. enterocolitica on hyvin heterogeeninen laji. On esitetty, että laji jaettaisiin kahteen, tai jopa kolmeen alalajiin (Howard ym. 2006). Kannat voidaan jakaa ei-enteropatogeenisiin ja enteropatogeenisiin kantoihin ja enteropatogeeniset kannat voidaan edelleen jakaa kahteen ryhmään, matalapatogeenisiin ja korkeapatogeenisiin (Neubauer ym. 2000).

2.1.1 Bio- ja serotyypit

Y. enterocolitica jaetaan biotyyppeihin biokemiallisten ominaisuuksien ja serotyyppeihin O-antigeenin perusteella. *Y. enterocolitica* eri bioserotyyppejä on eristetty laajasti erilaisista lähteistä ja usealta mantereelta (Carniel ym. 2006). *Y. enterocolitica* kannat voivat kuulua samaan serotyyppiin, mutta edustaa eri genotyyppiä (Wojciech ym. 2004).

Biokemiallisten ominaisuuksien perusteella bakteeri jaetaan kuuteen biotyyppiin: 1A, 1B, 2, 3, 4 ja 5 (Carniel ym. 2006). Biotyypit voidaan edelleen ryhmitellä kolmeen ryhmään patogeenisuuden mukaan. Biotyyppiä 1B pidetään virulenteimpana, ja biotyypit 2-5 luokitellaan matalan patogeenisyyden kannoiksi (Carniel ym. 2006). Biotyyppiä 1A ei pidetä patogeenisena. 1A-kantoja pidetään yleisesti ympäristökantoina, koska niiltä puuttuvat yersinian virulenssiplasmidi pYV ja tärkeimmät kromosomaaliset virulenssitekijät (EFSA 2007, Bhagat & Virdi 2011). On kuitenkin raportoitu tapauksia, joissa kyseinen biotyyppi on aiheuttanut tautia sopivissa olosuhteissa, kuten jos isännän vastustuskyky on heikentynyt (Campioni & Falcão 2014). Ihmisten tautitapauksiin on yhdistetty kaikki patogeeniset biotyypit 1B, 2, 3, 4 ja 5 (Bottone 2015).

O-antigeenin eli solukalvon lipopolysakkaridin O-sivuketjun rakenteen perusteella *Yersinia*-bakteerit jaetaan serotyyppeihin (Bottone 2015). *Y. enterocolitica* voidaan jakaa jopa 60 serotyyppiin, mutta ihmisten infektioihin on liitetty pääosin serotyypit O:3, O:8, O:9 ja O:5,27 (Bottone 1999). Eri yersinialajien on havaittu ilmentävän samoja serotyyppejä, mutta lajit eroavat muun perimän suhteen huomattavasti. Näin ollen epäillään, että eri yersinialajit pystyvät vaihtamaan O-antigeeniä koodaavaa geeniä keskenään (Kotetishvili ym. 2005).

Suomessa yleisin bioserotyyppi on 4/O:3. Vuosina 2006-2007 Suomesta kerätyissä näytteissä bioserotyypin prevalenssi teurassikojen nielurisoissa oli jopa 60 % (Rahikainen Ibañez ym. 2016). Euroopassa etenkin bioserotyyppi 4/O:3 ja 2/O:9 on yhdistetty ihmisten infektioihin (EFSA 2007).

2.1.2 Yersinioosi

Yersinioosi on enteropatogeenisten *Yersinia*-bakteerien aiheuttama tauti. Ihmisillä yersinioosi on yleisimmin *Y. enterocolitica* aiheuttama. Tulehduksen yleisin esiintymispaikka on tällöin sykkyräsuolen loppupää. Myös *Y. pseudotuberculosis* on todettu aiheuttavan yersinioosia.

Taudin itämisaika on 1-11 vuorokautta, ja puhkeamiseen vaadittava infektiomäärä on kokeellisesti todettu olevan noin 10^9 CFU/ml (Bottone 2015).

Yleisimmät *Y. enterocolitica* aiheuttaman yersinioosin oireet ovat akuutti suolistotulehdus, kuume ja joskus verinen ripuli. Infektion kesto vaihtelee parista päivästä muutamaa viikkoon. Nuorilla yersinioosi voi muistuttaa oireiltaan umpilisäkkeen tulehduksesta infektion ilmetessä suoliliepeen imusolmuketulehduksena (Fredriksson-Ahomaa ym. 2006). Yersinioosin patologiset löydökset vaihtelevat bio- ja serotyypin mukaan, 1B/O:8 – bioserotyypin aiheuttaessa vakavimman taudin. O:9-serotyypin aiheuttama tauti ilmenee varsin lievänä (Bottone 2015).

Yleisimmin *Y. enterocolitica* leviää isäntään ruuansulatuskanavan kautta, esimerkiksi kontaminoituneen elintarvikkeen välityksellä. Suolistossa bakteeri tunkeutuu tuottamiensa invasiiniproteiinien avulla isännän epiteelin läpi imukudoksen M-soluihin (Bottone 2015). Bakteerit pysähtyvät tyvikalvon alaiseen lamina propriaan, jossa ne lisääntyvät ekstrasellulaarisesti, kolonisoivat isännän Peyerin levyn ja suoliliepeen imusolmukkeet, muodostaen mikropaiseita (Revell & Miller 2001, Bottone 2015). Paiseiden muodostus tapahtuu *Y. enterocolitica* tuottamien YadA- ja Ail- proteiinien avulla, jotka hidastavat isännän immuunipuolustusta. Paiseiden kasvaessa ne hajottavat ympäröivää kudosta ja lopulta tuhoavat Peyerin levyt (Bottone 2015).

Bakteeri voi levitä edelleen pernaan. On epäselvää, tapahtuuko pernan infektoituminen suoliliepeen imusolmukkeista imuteitse vai veren välityksellä (Revell & Miller 2001). Molemmat reitit ovat mahdollisia, mutta veriteitse leviävä infektio olisi kohtalokkaampi isännän kannalta (Revell & Miller 2001). Jos bakteerit leviävät isännän vereen, voi paiseita syntyä suoliston imukudoksen lisäksi myös muun muassa maksaan (Bottone 2015).

Ensimmäinen dokumentoitu *Y. enterocolitica* aiheuttama sairastumistapaus todettiin vuonna 1939 New Yorkissa (Schleifstein & Coleman 1939). Taudin vakavuus nousi kuitenkin esille vasta vuonna 1976, kun 222 koululaista ja koulun työntekijää sairastui. Välittäjäelintarvikkeena toimi tällöin tuotantoprosessissa kontaminoitunut maito. Tapauksen yhteydessä havaittiin, että yersinioosin aiheuttamat oireet voidaan vahingossa diagnosoida umpilisäkkeen tulehdukseksi hyvin samankaltaisten oireiden vuoksi (Black ym. 1978).

Y. enterocolitica aiheuttamia suolistotulehduksia on havaittu myös lampailla, vuohilla ja jäniksillä. Myös koiran ja kissan ripuleista on eristetty *Y. enterocolitica* (Fredriksson-Ahomaa ym. 2001).

2.1.3 Tartuntatiet

Sikaa pidetään yhtenä *Y. enterocolitica* tärkeimpänä reservoaarina. Ihmisille tautia aiheuttavia bioserotyyppejä on eristetty teurassikojen nielurisoista ja ulostenäytteistä (Fredriksson-Ahomaa ym. 2006). On osoitettu, että useat ihmisistä eristetyt bioserotyyppien 4/O:3 ja 2/O:9 -kannat jakavat saman genotyypin sioista eristettyjen kantojen kanssa (Wojciech ym. 2004).

Y. enterocolitica biotyyppiä 4/O:3 esiintyy laajasti eurooppalaisilla lihasioilla (Fredriksson-Ahomaa ym. 2007, Bonardi ym. 2013, Le Guern ym. 2016). Lisäksi biotyyppijä 2 ja 3, sekä serotyyppejä O:5,27 ja 9 on eristetty sioista, naudoista, lampaista ja vuohista (Fredriksson-Ahomaa ym. 2006). Myös Suomessa yleisin *Y. enterocolitica* bioserotyyppi on sioilla esiintyvä 4/O:3. Virulentteja *Y. enterocolitica*-kantoja on eristetty Suomessa mm. sian kielistä (83 % näytteistä), maksoista (73 %), sydämistä (71 %) ja munuaisista (67 %) (Fredriksson-Ahomaa ym. 2006). Tutkimuksien mukaan emakoilla enteropatoogeenisen *Y. enterocolitica* prevalenssi Suomessa on 14 %, kun taas lihasioilla prevalenssi on noin 60 % (Korte ym. 2004, Rahikainen-Ibanez 2016). Korkea prevalenssi lihasikojen keskuudessa viittaa niiden olevan tärkeä patogeenin reservuaari. Syy emakoiden matalaan *Y. enterocolitica* prevalenssiin saattaa johtua kehitetystä luonnollisesta immunitetista kyseistä bakteeria kohtaan. Patogeenisistä kannoista biotyypin 4 kantojen prevalenssi oli sioissa kaikista suurin, ja kaikki biotyypin 4 kannat olivat serotyyppejä O:3 (Korte ym. 2004). Koska yersinioosi on zoonoosi, voi bakteeri tarttua siasta ihmiseen. Runsas sianlihan kulutus on yhdistetty suurempaan riskiin sairastua yersinioosiin (Ostroff ym. 1994).

On huomattu, että sikojen *Yersinia*-positiivisten ulostenäytteiden ja kontaminoituneen sikalaympäristön välillä on selvä yhteys (Pilon ym. 2000). Ranskassa tehdyssä tutkimuksessa todettiin, että jos *Y. enterocolitica* löytyi sikalaympäristöstä, keskimäärin kolmasosa sikojen ulostenäytteistä oli positiivisia. Tutkimuksen näytteistä 94 % oli serotyyppejä O:3. Yksikään sikalasta otettu jyrä- tai karpäänäyte ei ollut positiivinen, mikä sulkee pois ulkoisen reservuaarin. Samoin vesinäyte oli negatiivinen. Bakteeria eristettiin muun muassa ruokapaikoilta ja vesinipoista, eli paikoista missä siat vierailivat. Jokaisella näytteenottokerralla bakteerin genotyyppinen profiili oli tilan sisällä sama, mutta profiilit vaihtelivat tilojen välillä. Kahdella tilalla havaittiin sama genotyyppinen profiili, mutta nämä tilat ostivat eläimensä samalta porsitustilalta. Tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että emakot levittävät bakteerin suoraan vieroitettaviin porsaisiin, ja bakteerin primaari leviämistapa on siasta toiseen (Pilon ym. 2000). Bakteerin prevalenssi oli

huomattavasti suurempi sioissa kuin ympäristössä, joten sika saa todennäköisesti tartunnan huomattavasti yleisemmin toiselta sialta kuin ympäristöstä (Pilon ym. 2000).

Teurastamoissa *Y. enterocolitica* on yleinen kontaminantti (Fredriksson-Ahomaa ym. 2000). Teurastusprosessissa sian nielurisat pyritään irrottamaan kokonaisina elinpaketin poiston yhteydessä, mutta toisinaan osa nielurisoista jää ruhoon. Myös eläimen suoli voi vaurioitua prosessissa. Tällöin bakteerin leviämistä lihaan on lähes mahdotonta estää (Fredriksson-Ahomaa ym. 2000). Lihan säilyvyys turvallisena elintarvikkeena perustuu pääosin toimivaan kylmäketjuun, ja koska *Y. enterocolitica* selviää ja lisääntyy kylmässä, voi teurastamalla kontaminoitunut sianliha toimia edelleen tartuntalähteenä ihmisille. Raan tai alikypsytytyn sianlihan sekä lihan kanssa ristikontaminoitujen elintarvikkeiden syöminen on yleisin *Y. enterocolitica* leviämistapa ihmisiin (Le Guern ym. 2016). *Y. enterocolitica* on eristetty teurastamoissa myös ruhoista, työvälineistä, työntekijöiden esiliinoista, pinnoilta kuten lihantarkastajien tietokoneilta, sekä ilmanäytteistä (Fredriksson-Ahomaa ym. 2000). Näin ollen myös työntekijät levittävät bakteeria ympäristöönsä vaatteiden, käsien ja välineiden välityksellä.

Norjassa tehdyssä tutkimuksessa yhdistettiin sianliha ja yersinioosiin sairastuminen. Tutkimuksessa sairastuneet söivät huomattavasti enemmän sianlihaa ja makkaratuotteita kuin kontrolliryhmä (Ostroff ym. 1994). Lisäksi yersinioosin sairastaneet käyttivät harvemmin vettä ja saippuaa keittiön pintojen puhdistukseen (Ostroff ym. 1994). Tutkimuksessa ei havaittu korrelaatiota eläintilalla vierailemisen (kontakti sikojen kanssa) ja yersinioosiin sairastumisen välillä (Ostroff ym. 1994). Tutkimuksessa ei myöskään havaittu yhteyttä ravintolassa tai katukeittiössä syömisen ja tartunnan välillä. Näin ollen todennäköisimmin tartunta tapahtui alikypsennetyn lihan ja makkaratuotteiden välityksellä.

Norjassa vuonna 2011 pakattu salaattisekoitus yhdistettiin *Y. enterocolitica* O:9-epidemiaan, joka vahvisti ajatusta siitä, että myös kontaminoituneet raat vihannekset voivat toimia tartuntalähteenä (MacDonald ym. 2011). *Y. enterocolitica* on psykotrofinen, ja se sietää hyvin kylmiä olosuhteita, joten myös erilaiset valmisruuat voivat potentiaalisesti toimia tartuntalähteenä.

Myös lemmikkien on todettu saaneen yersiniatartunta kontaminoidusta sianlihasta. Tartunnan saanut lemmikki voi toimia oireettomana kantajana bakteerille ja levittää ulosteen mukana bakteeria myös ihmisiin (Fredriksson-Ahomaa ym. 2001).

Ihmisestä ihmiseen tapahtuva leviäminen ei ole yleistä. Yersinioosipotilasta käsitelleen sairaalahenkilökunnan sairastumista on kuvattu, mutta koska *Y. enterocolitica* infektiivinen annos on suuri, uskotaan potilaan ja työntekijöiden saaneen bakteerin samasta lähteestä sen sijaan, että sairastunut potilas olisi sen tartuttanut työntekijöihin (Toivanen ym. 1973). Epäsuoraa tartuntaa verensiirron yhteydessä on havaittu (Guinet ym. 2011). *Y. enterocolitica* selviää verensiirroissa hyvin psykrotrofisuudensa ansioista (Bottone 2015).

2.1.4 Virulenssi

Vain osa *Y. enterocolitica* – kannoista on patogeenisiä. Ihmisille patogeenisiä kantoja löytyy biotyypeistä 1B, 2, 3, 4 ja 5. Nykykäsityksen mukaan bakteeri tarvitsee *Yersinian* virulenssiplasmidin (plasmid of *Yersinia* virulence, pYV) kyetäkseen aiheuttamaan tautia (Petersen ym. 2015). Lisäksi *Y. enterocolitica* virulenssitekijöiden tuotantoa ohjaavia geenejä löytyy myös bakteerin kromosomista. Biotyyppin 1A kantoja ei pidetä patogeenisinä, koska niiltä puuttuvat *Yersinian* virulenssiplasmidi ja tärkeimmät kromosomaaliset virulenssitekijät. Kuitenkin biotyypin aiheuttamaa kliinistä tautia on havaittu, ja bakteeria on eristetty ripulipotilaiden ulostenäytteistä (Campioni & Falcão 2014).

Yersinian virulenssiplasmidi on 70 kb kokoinen. Plasmidin geenien transkriptio aktivoituu vasta 37 celsiusasteen lämpötilassa, eli bakteerin päädyttyä isännän elimistöön. Myös *Y. enterocolitica* motiliteetti loppuu 37 celsiusasteessa, mikä johtuu siitä, että bakteeri keskittää RNA-synteesinsä virulenssigeeneihin, ja flagellojen geenien luenta lakkaa (Kapatral ym. 1996). Virulenssiplasmidi tekee *Y. enterocolitica* kuitenkin kalsiumriippuvaisen, sillä plasmidi rajoittaa bakteerin kasvua kalsium-ionittomassa ympäristössä (Cornelis ym. 1998). Kasvua rajoittavissa ympäristöolosuhteissa bakteeri siirtyy ekspressoimaan plasmidin geenejä. Plasmidikoodattujen virulenssimekanismien lisäksi *Yersinian* virulenssimekanismeihin kuuluu komplementtien ja antimikrobiaalisten peptidien vastustaminen sekä tärkeiden hivenaineiden, kuten raudan, hankkiminen (Chung & Bliska 2016).

Pääosin plasmidigeenien tuottamat proteiinit voidaan jakaa kahteen kategoriaan: toiminnallisiin proteiineihin ja tyypin 3 sekreetiosysteemin proteiineihin (Cornelis ym. 1998). Tyypin 3 sekreetiosysteemin tarkoitus on kuljettaa Ysc (Yop secretion) –proteiinien avulla bakteerin tuottamia proteiineja (Yops) isännän solujen solulimaan, missä proteiinit vaikuttavat isäntäsolujen toimintaan (Cornelis ym. 1998, Chung & Bliska 2016). Proteiinit vaikuttavat muun muassa estämällä fagosytoosia ja indusoimalla apoptoosia (Bottone 2015). Bakteerin kiinnittyessä

isäntäsoluun adheesio toimii viestinä bakteerille vapauttaa yop-proteiineja (Cornelis ym. 1998). Yop-proteiineja on löydetty 12 kappaletta, ja ne vaikuttavat muun muassa neutrofiilien sisäiseen signaalointiin ja näin estävät solujen toiminnan (Allaoui ym. 1994, Cornelis ym. 1998, Chung & Bliska 2016). Samanlainen mekanismi on löydetty myös muilta patogeenisiltä bakteereilta, kuten salmonelloilta, shigelloilta ja *Pseudomonas aeruginosalta* (Cornelis ym. 1998). Kaikki yop-geenit on sekvensoitu ja niiden on todettu olevan lähes identtisiä kaikkien patogeenisten *Yersinia*-lajien kesken (Cornelis ym. 1998).

Virulenssigeeni *yadA*:n koodaama proteiini YadA on yksi *Yersinioiden* tärkeimmistä virulenssitekijöistä. Kuten muutkin plasmidigeenit, *yadA*-geeni aktivoituu vasta 37 °C. Geenin koodaamia proteiineja havaitaan bakteerin solukalvolla hyvin nopeasti sen jälkeen, kun ympäristön lämpötila on muuttunut 26 asteesta 37 celsiusasteeseen (Bolin ym. 1982). Ilman *yadA*-geeniä bakteeri ei pysty lisääntymään imukudoksen lamina propriassa. YadA-proteiini toimii adhesiinina, ja sen tehtäviin kuuluu muun muassa soluväliaineen molekyyleihin sitoutuminen. Proteiinin tärkein tehtävä on sitoutua kollageeniin, mutta se sitoutuu myös muihin soluväliaineen molekyyleihin, kuten fibronektiiniin tai laminiiniin (Gripenberg-Lerche ym. 1995, Mikula ym. 2013). Näihin adhesiin affiniteetti on kuitenkin huomattavasti pienempi kuin kollageeniin (Mikula ym. 2013). Kollageeniin sitoutumisen avulla YadA-proteiini saa aikaan sen, että *Y. enterocolitica* aiheuttaa reaktiivisen artriitin (Mikula ym. 2013).

YadA toimii adheesiossa isännän epiteelisoluihin. Adheesio ei tapahdu kuitenkaan suoraan kuten *Yersinioiden* toisen adheesioproteiinin, invasiinin, avulla. YadA sitoutuu isännän soluväliaineen molekyyleihin epiteelisolujen pinnalla, mikä aktivoi signaalikaskadin, jonka tehtävänä on houkutella paikalle leukosyyttejä (Mikula ym. 2013). YadA-proteiini estää leukosyyttien toiminnan, ja toimettomien leukosyyttien kerääntyminen johtaa lopulta kudostuhoon ja avustaa bakteerin leviämistä (Mikula ym. 2013). Toisin kun muita plasmidikoodattuja proteiineja, YadA-proteiinia tuotetaan riippumatta ympäristön kalsium-ionikonsentraatiosta (Cornelis ym. 1998). *Yersinian* YadA-adhesiini on tärkeä osa tyypin 3 sekreetiosysteemin toimintaa, sillä riittävä adheesio isäntäsoluun on edellytys Yop-proteiinien eritykselle isäntäsoluun (Cornelis ym. 1998, Bottone 2015).

Virulenssiplasmidin *virF*-geeni koodaa tärkeää transkriptioaktivaattoria, joka aktivoi plasmidin geenejä, kuten *yop*, *yadA* ja *ylpA* (Rouvroit ym. 1992). *virF*-geenin toiminta on lämpötilariippuvaista, mikä on myös syy *yop*-geenien lämpötilariippuvuuteen (Cornelis ym. 1989).

Myös *yadA*-geenin transkriptio riippuu olennaisesti *virF*-geenin aktivaatioista, mikä johtaa siihen, että YadA-adhesiinia ei tuoteta kuin 30–37 °C lämpötiloissa (El Tahir & Skurnik 2001).

Invasiini on kromosomaalinen virulenssitekijä, jota tuotetaan eniten 25 celsiusasteen lämpötilassa (Bottone 2015). *Y. enterocolitica* ilmentää proteiinia solukalvollaan jo ennen kuin se on kulkeutunut isännän elimistöön (Mikula ym. 2013). Proteiini toimii infektion alkuvaiheessa, ja sen tehtävänä on avustaa bakteerin kolonisaatiossa ja isäntäsoluihin tunkeutumisessa. Toimiva *inv*-geeni nopeuttaa bakteerin tunkeutumista suoliston epiteelin läpi huomattavasti (Revell & Miller 2001, Bottone 2015). Lisäksi kanta, jolla *inv*-geeni on kokeellisesti inaktivoitu, ei pysty infektoimaan mesenterisiä imusolmukkeita (Revell & Miller 2001). Invasiinin on myös todettu toimivan YadA-adhesiinin rinnalla adheesiomolekyylinä tyypin 3 sekreetiosysteemille. Invasiinin toiminta perustuu kykyyn sitoutua isännän beta1-integriineihin. Sekä integriinejä että invasiineja täytyy tuottaa runsaasti, jotta bakteeri pääsee tunkeutumaan epiteelisoluihin (Mikula ym. 2013). Translokaation jälkeen, Peyerin levyn basolateraalipuolella, invasiinin sitoutuminen isännän beta1-integriineihin käynnistää isännän kemokiinituotannon (Mikula ym. 2013). Ekspressoimalla YadA-proteiinia bakteeri kuitenkin suojautuu kemokiinituotannosta johtuvalta fagosytoosilta (Mikula ym. 2013).

Ulkomembraaniproteiini Ail (attachment-invasin locus) osallistuu bakteerin seerumiresistanssiin sitoutumalla isännän komplementtireitin proteiineihin. Kiinnittyminen estää komplementin aktivaation, ja edelleen bakteerin tunnistamisen ja hajottamisen komplementtireitin kautta (Balakrishna ym. 2010, Bottone 2015). Kyky suojautua isännän immuunipuolustukselta mahdollistaa bakteerin leviämisen mesenterisiin imusolmukkeisiin (Mikula ym. 2013). Ail avustaa myös epiteelisolujen invaasiassa, mutta sen merkitys ei ole yhtä suuri kuin invasiinin (Bottone 2015). Proteiinia koodaava *ail*-geeni sijaitsee bakteerin kromosomissa ja proteiinia tuotetaan vain yli 30 celsiusasteen lämpötilassa. On uskottu, että *ail*-proteiinia esiintyy vain patogeenisillä *Y. enterocolitica* -kannoilla, mutta *ail*-geeniä on havaittu myös ei-patogeenisillä biotyypin 1A-kannoilla (Sihvonen ym. 2011).

Yst-enterotoksiinit ovat *Y. enterocolitica*n tuottamia lämmönkestäviä toksineja, joiden merkitys bakteerin virulenssille on vielä epäselvä. YstA ja YstB ovat enterotoksiineja, jotka aktivoivat elimistön guanylaattisyklaasi-entsyymin. Entsyymin aktivaatio lisää nesteen kertymistä suoleen aiheuttaen ripulin (Revell & Miller 2001). YstA-tyypin enterotoksiini on yhdistetty pääosin patogeenisiin *Y. enterocolitica* -kantoihin, ja muiden enterotoksiinien (YstB ja YstC) esiintyminen patogeenisillä kannoilla on harvinaista (Ramamurthy ym. 1997). Ei-patogeenisillä kannoilla

ystB-geeni on kaikista yleisin, kun taas *ystC*-geenin esiintyminen todettiin yleisesti harvinaiseksi (Ramamurthy ym. 1997).

Korkeapatogeeniset *Y. enterocolitica* biotyypin 1B kannat erottuvat matalapatogeenisistä kannoista uniikin sekvenssialueen osalta, jota kutsutaan nimellä High-pathogenicity island (HPI). Kyseessä on useista geeneistä rakentuva, hyvin konservoitunut osa perimää, joka on tavattu useilta korkeapatogeenisilta bakteereilta (Rakin ym. 1999). Tämä kromosomaalinen osa perimää vaikuttaa muun muassa bakteerin raudankäyttöön ja koodaa tärkeitä proteiinireseptoreja (Carniel ym. 1996). Yersinioilta kyseistä sekvenssiä on tavattu *Y. pestikseltä*, *Y. pseudotuberculosiselta* sekä *Y. enterocolitica* biotyypiltä 1B. On kuitenkin havaittu, että *Y. enterocolitica* biotyypin 1B HPI muistuttaa huomattavasti enemmän *Escherichia coli* -bakteerin vastaavaa sekvenssialuetta kuin muiden yersinialajien sekvenssialueita (Carniel ym. 1996).

2.2 *Yersinia enterocolitica* 2/O:9

Y. enterocolitica bioserotyyppi 2/O:9 on Euroopassa yhdistetty ihmisten infektoihin, ja sen esiintyvyys on hiljalleen lisääntynyt. Biotyyppi 2 kuuluu matalapatogeenisiin yersinioihin, ja on *Y. enterocolitica* biotyypin 4 kanssa yleisin gastrointestinaalisen yersinioosin aiheuttaja (Rosner ym. 2010). Euroopassa bioserotyyppiä 2/O:9 on eristetty vaihtelevista lähteistä ja useasta Euroopan maasta. Bioserotyyppi on aiheuttanut tautia ihmisille muun muassa Sveitsissä, jossa sen prevalenssi tautitapauksien osalta on ollut yllättävän suuri (30 %) (Fredriksson-Ahomaa ym. 2012). *Y. enterocolitica* bioserotyyppi 2/O:9 on zoonoosi, mutta eläimissä se ei yleensä aiheuta oireita. Siat, lampaat ja naudat tunnetaan enteropatoogeenisten yersinioiden reservuaareina (Chenais ym. 2012).

2.2.1 Esiintyminen

Y. enterocolitica prevalenssi Suomessa on yksi Euroopan korkeimmista. Vuonna 2014 todettiin ihmisillä yhteensä 579 yersinioositapausta, joista 87 % oli *Y. enterocolitica* aiheuttamia (EFSA & ECDC 2015). Tähän asti suomalaisista teurassioista on löydetty ainoastaan bioserotyyppiä 4/O:3, mutta tutkimuksissa suomalaisista teuraslampaista 2 % todettiin positiiviseksi bioserotyypille 2/O:9 (Rahikainen Ibañez ym. 2016, Joutsen ym. 2016). Vuonna 2015 Suomen tartuntatautirekisteriin ilmoitettiin 560 *Y. enterocolitica* aiheuttamaa tartuntaa. Näistä 267 todettiin Helsingin ja

Uudenmaan sairaanhoitopiirissä, jossa 7 % taudinaiheuttajista tyypitettiin bioserotyypiksi 2/O:9 (Jaakola ym. 2015). Muut isolaatit olivat biotyyppiä 1A (71 %) tai 4/O:3 (22 %).

Ranskassa eristettiin vuosina 1931–2013 noin 20 000 yersinianäytettä vaihtelevista lähteistä. Näistä 59 % oli ihmisille patogeenisiä kantoja, ja yleisimmät kannat olivat *Y. enterocolitica* bioserotyyppejä 4/O:3 (67 %) ja 2/O:9 (24 %) (Le Guern ym. 2016). 2/O:9-kannat eristettiin pääosin naudoista, vuohista ja lampaista, mutta bioserotyyppejä löytyi myös ympäristöstä.

Toisin kuin valtaosassa Euroopan maista, yleisimmäksi bioserotyypiksi Isossa-Britanniassa on todettu *Y. enterocolitica* 2/O:9. Vuosina 2003–2005 kerätyistä sikojen nielurisanäytteistä 69 % todettiin positiiviseksi enteropatogeeniselle *Y. enterocolitica*, ja näistä isolaateista 34 % kuului bioserotyyppiin 2/O:9 (Ortiz Martínez ym. 2010). Britannian sikapopulaatiota pidetään nykykäsityksen mukaan tärkeänä reservuaarina kyseiselle bioserotyypille.

Bioserotyyppejä on löydetty myös Euroopan ulkopuolelta. Vuonna 2009 Nigeriassa *Y. enterocolitica* 2/O:9 – kantoja eristettiin ihmisten ulosteesta (Okwori ym. 2009). Näissä tapauksissa kyseinen bioserotyyppi oli ainut potilailta eristetty patogeeninen yersiniakanta. Kyseistä bioserotyyppejä eristettiin tutkimuksen yhteydessä myös sioista sekä eri ruokalähteistä, kuten fermentoidusta maidosta. Yersinia on perinteisesti pidetty lauhkean ilmaston patogeeninä, mutta tutkimus osoitti, että bakteeri on yleinen löydös myös trooppisimmilta alueilta. Bioserotyyppejä 2/O:9 on eristetty sioista myös Turkissa (Bozcal ym. 2015).

Toistaiseksi 2/O:9-bioserotyypin esiintyvyys sioilla on ollut manner-Euroopassa alhainen. Vuosina 2005–2007 lihasioista kerättiin nielurisanäytteitä Belgiasta, Italiasta ja Espanjasta. Tutkimuksissa ei havaittu bioserotyyppejä 2/O:9, ja odotetusti bioserotyyppi 4/O:3 oli yleisin (Ortiz Martinez ym. 2011). Sveitsissä bioserotyyppejä 2/O:9 on löydetty villisioista (Fredriksson-Ahomaa ym. 2009). Vuonna 2015 Saksasta kerätyistä villisikojen nielurisanäytteistä vain 17 % näytteistä oli positiivisia *Y. enterocolitica*, ja nämä isolaatit edustivat biotyyppijä 1A ja 1B (von Altrock ym. 2015).

Italialaisella teurastamolla sioista kerätyistä näytteistä 17 % ulostenäytteistä; 2 % ruhoista ja 11 % nielurisoista oli *Y. enterocolitica* – positiivisia. Näistä 4 % kuului 2/O:9-bioserotyyppiin, ja nämä kannat eristettiin sikojen ruhoista (Bonardi ym. 2013). Sveitsissä yleisin sioista eristetty bioserotyyppi on 4/O:3, mutta teurastamoissa on havaittu myös 2/O:9 – kantoja (Fredriksson-Ahomaa ym. 2007).

2.2.2 Ristireaktio *Brucella*-bakteerin kanssa

Bruselloosi, eli *Brucella*-suvun bakteerien aiheuttama tauti, on yksi yleisimmistä zoonoottisista infektiosta maailmalla. Esiintyvyyden ollessa suuri mm. kehitysmaissa, se luokitellaan myös yhdeksi laiminlyödyimmistä ihmisten taudeista (Chenais ym. 2012). Ihmisillä bruselloosi voi ilmetä monin tavoin: tauti voi olla täysin asymptomattinen, tai aiheuttaa vahvoja epäspesifejä kuumeiluoireita, kuten kuumetta, huonovointisuutta, päänsärkyä ja selkäkipuja. Tauti leviää ihmisiin yleensä sairaan eläimen virtsan, maidon tai kohtunesteen kautta, ja näin ollen taudin ehkäisyyn kuuluu ihmistartuntojen minimoimisen lisäksi taudin poistamista alueen eläinpopulaatiosta (Chenais ym. 2012).

Brucella-bakteerin hävittämisessä on ongelmaksi muodostunut runsas määrä vääriä positiivisia testituloksia (Chenais ym. 2012). On huomattu, että serologisissa tutkimuksissa vääriä positiivisia tuloksia antaneet lampaat kantavat O:9-serotyyppin *Y. enterocolitica*. *Y. enterocolitica* O:9-antigeenin rakenne on todettu olevan lähes identtinen lampailla esiintyvän *Brucella melitensis* –bakteerin antigeenin kanssa. Näin ollen serologisissa testauksissa eläin, joka kantaa tätä *Yersinia*-serotyyppiä antaa väärän positiivisen tuloksen *Brucella*-bakteerille. Yksikään käytössä olevista serologisista testeistä ei kykene erottamaan *Brucella*- ja *Yersinia*-tartuntaa toisistaan (Chenais ym. 2012). Tämän seurauksena serologiset testaukset eivät ole luotettavia lampailla bruselloosin diagnostiikassa. Ainoastaan bruselloosin varalta tehtävä ihotesti on todettu spesifiseksi (Chenais ym. 2012).

Suomi on todettu vapaaksi *Brucella*-bakteereista (EFSA & ECDC 2015). Kuitenkin, *Y. enterocolitica* bioserotyyppin 2/O:9 levitessä eläinten testaus *Brucella*-suvun bakteereita vastaan voi vaikeutua huomattavasti väärien positiivisten tulosten myötä.

2.3 MLST (multilocus sequence typing)

MLST eli multilocus sequence typing on menetelmä, jonka avulla voidaan tunnistaa bakteereita ja seurata niiden epidemiologiaa ylläpitogeneenien (housekeeping genes) avulla. MLST- menetelmä tunnistaa bakteerin tarkasti jopa alalajin tarkkuudelle, ja geenien suora sekvensointi antaa tarkemman tuloksen kuin esim. elektroforeesiin perustuvat menetelmät (Enright & Spratt 1999, Hall ym. 2015).

MLST-menetelmän tarkoituksena on luokitella bakteereita niiden ylläpitogeenien sekvenssien mukaan. Menetelmässä sekvensoidaan 6-10 ylläpitogeenin sisältä noin 500 emäsparin pituinen DNA-fragmentti (Chan ym. 2001, Glaeser & Kämpfer 2015). Jos fragmentin sekvenssiä ei ole aikaisemmin tavattu, annetaan sille yksilöllinen tunniste, alleelinumero. Valittujen ylläpitogeenien fragmenttien alleelinumerot muodostavat yhdessä bakteerin alleeliprofilin (Chan ym. 2001). Alleeliprofiileilla on myös yksilölliset tunnistenumerot, joita kutsutaan bakteerien sekvenssityypeiksi (Chan ym. 2001). Sekvenssityyppejä voidaan verrata internet-serverien MLST-tietokannan aiemmin tutkittuihin kantoihin. Huolellisesti valittujen ylläpitogeenien paneelilla suoritettu MLST-menetelmä on yhtä tarkka tunnistamaan jopa alalajeja kuin kokogenomisekvensointi (Rosner ym. 2010).

MLST-menetelmä on hyödyllinen tapa selvittää ja seurata bakteerien patogeenisuutta ja antibioottiresistenssiä (Chan ym. 2001). Menetelmän vahvuus on se, että saatu data on yksiselitteistä. Tieto voidaan säilyttää keskustietokannassa, josta informaatiota voidaan etsiä internet-serverin kautta (Chan ym. 2001). Lisäksi MLST-menetelmän etu on se, että sekvenssityypin määrittämiseen tarvitaan vain eristettyä DNA:ta tai kuolleita soluja suspensiossa. Näin ollen näytteet on helppo kerätä ja kuljettaa (Urwin & Maiden 2003).

2.3.1 Ylläpito (housekeeping) – geenit

Ylläpito- eli housekeeping –geenit ovat bakteerien geenejä, jotka stabiloivat proteiinien muodostamista ja näin ollen turvaavat bakteerin metabolian. Ympäristön valinta suosii näissä geeneissä mutaatioista niitä, jotka eivät muuta syntyvän aminohapon rakennetta (Urwin & Maiden 2003).

Mutaatioiden kerääntyminen ylläpitogeeneihin on hidasta ja niistä muodostettu bakteerin alleelinen profiili on varsin stabiili, minkä vuoksi niiden avulla voidaan tutkia patogeenin globaalia leviämistä (Enright & Spratt 1999). Globaalisesti tutkiessa on tärkeää välttää genomien osia jotka muuntautuvat nopeasti ympäristön paineen myötä (Urwin & Maiden 2003). Tällaisia ovat esimerkiksi osat, jotka säätelevät bakteerin reaktiota antimikrobisiin lääkeaineisiin tai isännän immuunipuolustukseen. Lisäksi rekombinoituissa populaatioissa on tärkeää saada geneettistä informaatiota useasta kromosomaalisesta lokuksesta, jotka hyvin epätodennäköisesti ovat yhdessä periytyviä (Urwin & Maiden 2003). MLST-menetelmällä on havaittu, että myös nopeasti rekombinoituvilla bakteerilajeilla, kuten *Streptococcus pneumoniae* ja *Helicobacter pylori*, on ylläpitogeenien suhteen

selviä klonaalisia ryhmiä (Achtman ym. 1999). Näin ollen ylläpitogeenit rekombinoituvat huomattavasti hitaammin kuin monet muut geenit.

Koska MLST-menetelmällä halutaan saada esiin saman bakteerilajin sisäisiä vaihteluita, täytyy tutkimuksiin valita ylläpitogeenit, joiden sisällä kuitenkin esiintyy hieman vaihtelua. Näin ollen menetelmällä ei voida luotettavasti vertailla eri bakteerilajeja tai hyvin heterogeenisiä bakteerikantoja toisiinsa (Maiden ym. 2013).

2.3.2 Sekvensointi

MLST-menetelmässä jokaiselle eri bakteerilajille on standardoitu oma kokoelma sopivia ylläpitogeenejä (Chan ym. 2001). Menetelmässä ylläpitogeeneistä sekvensoidaan tunnettu noin 500 emäsparin kokoinen osa (Chan ym. 2001). Juuri 500 emäsparin fragmentti on optimaalisin pituus menetelmään, sillä se voidaan sekvensoida perinteisellä Sangerin sekvensointimenetelmällä tarkasti käyttämällä vain yhtä paria alukkeita. Lisäksi fragmentti on tarpeeksi pitkä kertoakseen riittävästi bakteerikantojen välisistä variaatioista (Enright & Spratt 1999).

Ensimmäinen DNA-sekvensointimenetelmä perustui DNA-polymeraasin toimintaan (Sanger ym. 1977). Menetelmän kehitti vuonna 1977 Frederick Sanger, jonka mukaan Sangerin sekvensointi on nimetty. Normaalisti DNA-polymeraasi monistaa DNA-juosteen lisäämällä nukleotideja ketjuun peilaten sitä vastinjuosteeseen. Sangerin menetelmässä hyödynnetään tätä polymeraasin toimintaa sekoittamalla reaktioon mukaan käsiteltyjä nukleotideja. Näistä käsitellyistä nukleotideista puuttuu 3'-päästä hydroksyliryhmä, minkä vuoksi DNA-polymeraasi ei voi jatkaa reaktiotaan tämän nukleotidin jälkeen. Näin ollen PCR-tuotteeseen jää hyvin erikokoisia pätkiä DNA:ta. Kun fragmentit ajetaan elektroforeesissa, ne järjestäytyvät pituuden mukaan. Käsitellyt nukleotidit on merkitty fluoresoivalla aineella, ja voidaan näin lukea elektroforeesista. Näin ollen järjestäytyneistä fragmenteista voidaan lukea alkuperäisen DNA-fragmentin sekvenssi (Sanger ym. 1977).

Kun tarve kokonaisten genomien sekvensoinnille kasvoi, täytyi sekvensointimenetelmien kehittyä nopeammiksi ja kustannustehokkaammiksi. Näin syntyivät uuden sukupolven sekvensointimenetelmät. Vuonna 2005 esiteltiin ensimmäinen pyrosekvensointiin perustuva menetelmä, joka mahdollisti miljoonien emäsparien luennan yhdellä kerralla (Vincent ym. 2016). Uuden sukupolven sekvensointimenetelmät ovat onnistuneet vähentämään esimerkiksi ihmisgenomin sekvensoinnin kustannukset miljardeista dollareista vain tuhansiin dollareihin.

Menetelmät eivät kuitenkaan ole täydellisiä, ja analysoitavien fragmenttien kasvaessa myös virheiden esiintyvyys sekvensoinnissa lisääntyy (Vincent ym. 2016).

2.3.3 MLSA

MLSA eli multilocus sequence analyzing on MLST-menetelmän perusteella taksonomiseen tutkimukseen kehitetty menetelmä (Glaeser & Kämpfer 2015). Kun MLST keskittyy pääosin bakteerien epidemiologiseen ja populaatiotason tutkimukseen, MLSA-menetelmän avulla pyritään tutkimaan myös eri lajien välisiä taksonomisia suhteita, ja seuraamaan eri bakteerikantojen välisiä fylogeneettisiä suhteita.

MLSA-menetelmän perustana on vielä tarkempi geenien valinta kuin MLST-menetelmässä. Bakteereilla tulisi olla vain yksi kopio tutkittavaa geeniä, ja geenien tulisi esiintyä laajasti eliökunnassa, jotta eri lajien välisiä taksonomisia suhteita voidaan verrata. Lisäksi MLSA-tutkimuksessa on tärkeä erotella mutaatioiden aiheuttamat synonyymiset aminohapon korvautumiset ei-synonyymisistä aminohappojen korvautumisista, koska vain aminohapposekvenssillä on merkitystä bakteerien fylogeneettisiin eroihin. MLST-menetelmässä aminohapoilla ei sinänsä ole merkitystä, kun bakteereja ryhmitellään ainoastaan geenisekvenssien mukaan.

2.4 Yersinioiden MLST-genomisekvensointi

Yersinioiden tunnistus on pitkään perustunut biotyypitykseen. Biotyypitys perustuu bakteerin kykyyn hyödyntää erilaisia biokemiallisia substraatteja. Biotyypityksen ongelma on sen subjektiivisuus, ja herkkyys ympäristön vaikutuksille, kuten inkubaatiolämpötilalle (Rosner ym. 2010).

MLST-menetelmä luotiin alun perin meningokokkien tunnistukseen, mutta menetelmä levisi nopeasti muidenkin patogeenien tunnistukseen. Ensimmäinen yritys hyödyntää menetelmää yersinioiden tunnistukseen tapahtui vuonna 2005, kun Kotetishvili ym. (2005) valitsivat viisi geeniä MLST-analyysiin (*16S RNA*, *glnA*, *gyrB*, *recA*, *Y-HSP60*). Nämä viisi lokusta eivät kuitenkaan kyenneet erottelemaan alalajeja toisistaan tarpeeksi tarkasti (Kotetishvili ym. 2005). Myöhemmin Sihvonen ym. (2012) ja Duan ym. (2014) käyttivät *Y. enterocoliticaa* sekvensoidessaan pääosin

Y. pseudotuberculosis MLST-sekvensointiin kehitettyjä alukkeita, joiden avulla nonpatogeeniset *Y. enterocolitica* -kannat saatiin eroteltua selvästi patogeenisistä kannoista. Vuonna 2015 Hall ym. (2015) onnistuivat valikoimaan *Y. enterocolitica* perimästä ne seitsemän geeniä (*aarF*, *dffp*, *galR*, *glnS*, *hemA*, *speA*, *rfaE*), jotka pystyivät tunnistamaan alalajitasolle asti yhtä tarkasti kuin kokogenomisekvensointi. Koska tällä hetkellä tutkimukset on suoritettu hyvin erilaisilla geenikombinaatioilla, on tutkimuksia hyvin vaikea vertailla keskenään.

Tutkimuksissa on havaittu, että *Y. enterocolitica* on ylläpitogeeniensä suhteen varsin yhtenäinen. Kun 13 kannan ylläpitogeenit sekvensointiin, havaittiin, että vaihtelua näissä geeneissä oli vain 4-6 %, vaikka kannat edustivat hyvin erilaisia bioserotyypppejä, ja ne oli eristetty eri maista (Achtman ym. 1999). Kuitenkin *Y. enterocolitica* on yersinioista yksi monimuotoisimmista (Kotetishvili ym. 2005).

3. TYÖN TAVOITTEET JA HYPOTEESI

Tämän liseniaatin työn tavoitteena oli tutkia suomalaisten *Y. enterocolitica* 2/O:9 -kantojen sisäistä vaihtelua kyseisten ylläpitogeenien muodossa, ja verrata näitä Euroopasta eristettyihin kantoihin. Lisäksi tarkoituksena oli muokata MLST-menetelmästä toimiva protokolla Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osastolle. Menetelmää ei juuri näillä geeneillä ollut osastolla aiemmin testattu.

Oletuksemme oli, että Suomesta eristettyjen ja ulkomailta eristettyjen kantojen välillä esiintyisi selviä eroja, viitaten kaukaisempaan yhteiseen alkuperään. Suomalaisten kantojen odotettiin olevan hyvin homogeenisiä. Koska kyseisillä geeneillä MLST-menetelmää ei ole käytetty aikaisemmin Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osastolla, uskoimme myös menetelmän pystyttämisen olevan haastavaa. Näin ollen odotuksina oli, että menetelmä saataisiin toimimaan edes joidenkin geenien ja kantojen kohdalla.

4. MATERIAALI

Tutkimuksessa käytettiin Helsingin yliopiston Eläinlääketieteellisen tiedekunnan Elintarvikehygienian- ja ympäristöterveyden osastolta valmiiksi löytyviä *Y. enterocolitica* kantoja, jotka esitietojen mukaan kuuluivat biotyyppiin 2 ja olivat serotyyppiä O:9. Kannat on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1 Tutkimuksessa käytetyt *Yersinia enterocolitica* -kannat

Kanta-numero	Nimi	Lähde	Eristyspaikka	Eristysvuosi
1	HYE 3891	Ihmisen uloste	Saksa	2002
2	IHI 111222	Ihmisen uloste	Suomi	1999
3	SWHY 119	Ihmisen uloste	Sveitsi	2011
4	SWT 207	Sian nielurisa	Sveitsi	2006
5	MY M2 9A17	Myyrän suoli	Suomi	2005
6	WSTY 128	Villisian nielurisa	Sveitsi	2008
7	LAS 380	Lampaan uloste	Suomi	2013
8	LAS 395	Lampaan uloste	Suomi	2013
9	LAS 412	Lampaan uloste	Suomi	2013
10	LAS 416	Lampaan uloste	Suomi	2013

5. MENETELMÄT

5.1 Kantojen kuvaus

5.1.1 Kasvu selektiivialustoilla

Kantoja oli säilytetty osastolla helmiputkissa pakastettuna (-70 °C). Kannat viljeltiin hajalevityksellä helmiputkista naudanveriagarille (Liite 1) ja maljoja inkubointiin 24 h (28 °C). Inkuboinnin jälkeen viljelmät todettiin puhdasviljelmiksi, jonka jälkeen kasvustosta tehtiin uudet helmiputket pakkaseen (-20 °C), joita käytettiin tutkimuksen aikana.

Viljellyltä veriagarilta tehtiin myös bakteerisuspensio: 5 ml steriiliä vettä johon lisättiin 1 µl kertakäyttösilman verran bakteerimassaa. Suspensiota viljeltiin sen puhtauden testaamiseksi uudelleen veriagarille. Suspensiota otettiin 1 µl kertakäyttösilman verran ja hajalevitettiin agarille. Lisäksi suspensiota viljeltiin 1 µl kertakäyttösilman verran CIN-agarilla (kefsulodiini-triklosaani-novobiosiini) (Liite 1) nähdäksemme yersinioille tyypillisen pesäkemorfologian. Kyseisellä agarilla bakteerin pesäkkeet saavat punaisen keskustan, eli niin sanotun häränsilmän, johtuen mannitolin fermentaatiosta (Bottone 2015). Kantoja inkuboitin maljoilla 24 h (28 °C).

5.1.2 Tunnistus

Alustava lajitunnistus ja osa kantojen biotyypitystesteistä tehtiin Api20E System -menetelmällä (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Ranska). Menetelmä tunnistaa bakteereita niiden biokemiallisten ominaisuuksien perusteella. Testissä käytettiin aiemmin mainittua bakteerisuspensiota, ja testejä inkuboitin valmistajan ohjeiden mukaan 24 h (28 °C). Tulokset tulkittiin kullekin reaktiolle tyypillisen värimuutoksen mukaan valmistajan ohjeiden avulla ja saatuja tuloksia verrattiin valmistajan apiweb-tietokantaan (<https://apiweb.biomerieux.com/>).

Api20E-menetelmän lisäksi biotyypitystä tehtiin ureaputkien (Liite 1), sokeriputkien (Liite 1) ja tween-maljojen (Liite 1) avulla. Verimaljoilta tehtyä suspensiota viljeltiin 1 µl kertakäyttösilman verran urea-agarille (2 ml Eppendorf-putki, vinopinta), jonka avulla testattiin bakteerin urean hyödyntäminen. Lisäksi suspensiota lisättiin 3 tippaa 0,5 ml sokeriputkiin (trehaloosi, salisiini ja ksylatsiini), jonka avulla selvitettiin kantojen kyky hyödyntää sokereita. Sekä sokeri- että ureaputkia inkuboitin 24 h (28 °C). Positiiviseksi testiksi laskettiin ureaputkien kohdalla

värimuutos kellertävästä vaaleanpunaiseksi, ja sokeriputkien kohdalla värimuutos sinivihreästä keltaiseksi. Bakteerien tunnistusta varten tehtyä bakteerisuspensiota viljeltiin myös 1 µl kertakäyttösilmutkan verran tween-agarille. Agareita inkuboitiin 48 h (28 °C). Tween-agarit luettiin luonnonvalossa, ja positiiviseksi laskettiin utuinen kasvusto agarin pinnalla.

Kantojen virulenssia testattiin eskuliinimaljojen (Liite 1) ja pyratsinamidaasi (pyz) -agarin avulla (Liite 1). Bakteerien tunnistusta varten tehtyä bakteerisuspensiota viljeltiin 1 µl kertakäyttösilmutkan verran eskuliiniagareille. Lisäksi suspensiota viljeltiin 1 µl kertakäyttösilmutkallinen 10 ml pyz-agareille (10 ml koeputki, vinopinta). Eskuliiniagareita inkuboitiin 24 h (28 °C), pyz-agareita 48 h (28 °C). Eskuliini-agarit luettiin UV-valossa, ja positiiviseksi laskettiin tummentuma kasvuston ympärillä. Pyz-agarin pinnalle lisättiin inkuboinnin jälkeen ammoniumferrosulfaattiliuosta (0,014 g/1 ml vettä) ja seurattiin reaktiota 60 s. Positiiviseksi reaktioksi laskettiin punainen värireaktio agarin vinopinnalla.

Serotyypitys tehtiin bakteerisuspensiosta viljellyiltä verimaljoilta. Testauksessa käytettiin kaupallisia vasta-aineita (Denka Seiken CO., LTD, Tokyo, Japani) serotyypeille 1-2, 3, 5, 8 ja 9. Lisäksi negatiivisena kontrollina käytettiin autoklavoitua vettä. Vasta-ainesuspensioita ja vettä lisättiin kutakin pisara maljalle, joihin sekoitettiin yksi bakteeripesäke ja seurattiin 30–60 s muutosta. Positiiviseksi muutokseksi laskettiin nestepisaran sisään muodostunut vaalea, rakeinen agglutinaatiomassa.

5.2 MLST

5.2.1 DNA:n eristäminen

DNA:n eristämiseksi kannat viljeltiin -20 °C helmiputkista verimaljoille (Oxoid Ltd, Cheshire, England) ja inkuboitiin 24 h (28 °C). Maljalta valittiin yksi pesäke, joka viljeltiin 10 ml TSB-elatusliemeen (Oxoid Ltd, Hampshire, England). TSB-putkea inkuboitiin 24 h (28 °C) ravistimessa (250 rpm). Inkuboinnin jälkeen elatuslientä siirrettiin 2 ml Eppendorf-putkeen (2 ml) ja sentrifugoitiin 10 min (7500 rpm).

Sentrifugoinnin jälkeen Eppendorf-putkesta poistettiin neste ja DNA-eristystä jatkettiin DNeasy Blood & Tissue Kit –menetelmällä (Qiagen, Hilden, Saksa). Eristyksessä noudatettiin menetelmän

ohjeita. Menetelmän viimeinen vaihe, eli DNA:n eluutio Eppendorf-putkeen DNeasy-membraanilta, toistettiin kahdesti eluaatin DNA-saannon maksimoimiseksi.

DNA-tuotteen määrä varmistettiin Qubit (Invitrogen, Carlsbad, USA) -menetelmällä. Menetelmässä käytettiin valmistajien ohjeistusta, joissa mittaukseen näytettä käytettiin 2 µl ja käyttöliuosta 198 µl. Raja-arvona riittävälle DNA-saannille pidettiin konsentraatiota 20 ng/µl. Kaikki muut paitsi yksi DNA-tuote ylitti alarajan, mutta otimme tutkimukseen mukaan myös tämän näytteen: kannan 8 DNA-tuotteen konsentraatio oli 18,4 ng/µl. Otimme tämän huomioon myöhemmin geenien monistamisvaiheessa.

DNA-tuotteiden laatu varmistettiin Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, USA) -menetelmällä. Nanodropissa mittaukseen otettiin 2 µl näytettä. Puhtaus tulkittiin menetelmän arvoista 260/280 ja 260/230. Valmistajan ohjeiden mukaan puhtauden raja-arvona pidettiin 260/280-arvolle 1,8 ja 260/230-arvolle väliä 2,0-2,2. Kaikki näytteet olivat 260/280 -arvoltaan yli 1,8 (1,97-2,16). 260/230 -arvoiltaan näytteistä osa oli hiukan ylärajan yli (max. 2,29). DNA-tuotteiden Qubit- ja Nanodrop-arvot on lueteltu taulukossa 2.

Taulukko 2 DNA-tuotteiden määrän ja laadun arviointi

Menetelmä	Kanta									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Qubit (ng/µl)	20,8	68,4	57,6	54,5	83,7	50,5	44,0	18,4	25,6	39,2
Nanodrop										
260/280	2,16	2,11	2,04	2,08	2,04	2,04	2,05	1,97	2,00	1,98
260/230	2,18	2,22	2,09	2,29	2,26	2,17	2,20	2,08	2,17	2,22

5.2.3 Geenien monistaminen

Tutkimukseen valittiin ylläpitogeenit ja alukkeet aikaisempien tutkimustulosten perusteella (Hall ym. 2015). Käytetyt alukkeet on lueteltu taulukossa 3.

Varsinaisen geenien monistumisen onnistumisen varmistamiseksi määritimme käytettyjen alukkeiden kiinnittymiselle optimilämpötilat lämpötilagradientti-PCR:n avulla. Lämpötilagradientissa testasimme PCR-reaktiassa 12 alukkeiden kiinnittymislämpötilaa tasaisesti

väliltä 50-61 °C. Lisäksi testasimme gradientissa kahta eri DNA-määrää PCR-reaktiolle: 10 ng ja 20 ng.

Taulukko 3 Tutkimuksessa käytetyt alukkeet

MLST geeni	Alukkeet (Hall ym. 2015)		PCR- tuotteen pituus (bp) ^a	MLST- alueen pituus (bp) ^a	Alukkeiden kiinnittymis- lämpötila (°C) ^b
	Forward	Reverse			
<i>aarF</i>	5'-TTCCATGCAGATATGCACC-3'	3'-CCACTCACTAATAGTGTAGC-5'	650	500	52
<i>dfp</i>	5'-GATCCGGTACGCTTTATCAG-3'	3'-CATAACGGCTGACAATCTCG-5'	547	455	57
<i>galR</i>	5'-ATTGGTAACGGTTACCATG-3'	3'-GTTGGGCTGAACATATTGGT-5'	648	500	55
<i>glnS</i>	5'-GAATCATGTATCCGTGATG-3'	3'-GCACAGAAATAACCTTCAC-5'	557	442	56,6
<i>hemA</i>	5'-ATGACTCTGCTCGCATTAGG-3'	3'-CGGTTGGCAATAATCATATG-5'	602	490	56,6
<i>speA</i>	5'-ATGTCTGATGATAACTTGATT-3'	3'-CAGATAAACTTTATGGCCC-5'	550	452	56,6
<i>rfaE</i>	5'-ATGAAAGTCACTCTGCCTGA-3'	3'-ATCACTGCCTTTAGGATC-5'	509	429	50,0

^a Arvioidut pituudet (Hall ym. 2015)

^b Lämpötilagradientin avulla määritetty optimilämpötila alukkeiden kiinnittymiselle

Geenien monistamiseen käytettiin valmista, kaupallista reagenssiseosta HotStarTaq Master MIX Kit (Qiagen, Hilden, Saksa), joka sisälsi polymeraasia (HotStarTaq DNA Polymerase), puskuria (PCR Buffer), ja 400 µM jokaista nukleotiditrifosfaattia.

PCR-reaktiot ajettiin laitteella PTC-200 DNA Engine Cycler (MJ Research, Waltham, USA). Gradientti-PCR:n ohjelma on esitetty taulukossa 4. Alkudenaturaatioaika oli 15 min käytetyn polymeraasin aktivoimiseksi. Loppujäähdytyksen aika vaihteli 5-15 minuutin välillä.

Taulukko 4 Lämpötilagradientti-PCR:n ohjelma

Vaihe	Lämpötila	Aika
1. Alkudenaturaatio	95 °C	15 min
2. Denaturaatio ^a	94 °C	30 s
3. Alukkeiden kiinnittyminen ^a	50-61 °C	30 s
4. Monistus ^a	72 °C	60 s
5. Stabilointi	72 °C	10 min
6. Jäähdytys	4 °C	5-15 min

^a Vaiheet 2-4 toistettiin ajon aikana 30 kertaa ennen siirtymistä eteenpäin ohjelmassa

Gradientin PCR-tuotteet ajettiin geelielektroforeettisesti 1,0 % TAE-geelillä (Taulukko 5). Elektroforeesi ajettiin Pharmacia EPS300 Electrophoresis Power Supply –laitteella (Pharmacia Biotech, Uppsala, Ruotsi). Geelejä ajettiin 1 h arvoilla 330 mA ja 100 V TAE-ajoliuoksessa. Geelit kuvattiin ultraviolettivalossa, jolloin saimme esiin etidiumbromidin värjäämät DNA-juosteet. Elektroforeesista valitsimme optimaalisen lämpötilan PCR-ajolle sen perusteella, mikä juosterypäs näytti geelikuvassa oikean pituiselta (suhteessa molekyylipainomarkeriin), kirkkaalta (runsaasti juosteita monistunut) sekä selkeärajaiselta (kaikki juosteet ovat saman pituisia). Geelikuvasta pystyimme päättämään optimaalisen lämpötilan PCR-ajolle valitsemalla se näyte, jonka elektroforeesissa juoste näytti oikean pituiselta, kirkkaalta ja selkeärajaiselta.

Taulukko 5 1,0 % TAE-geeli

Ainesosa	Määrä	Valmistaja
Agar base	0,32 g	Lonza, Rockland, USA
25 % TAE	1,6 ml	Amresco, Solon, USA
Etidiumbromidi	2 ml	
Tislattu vesi	197 ml	

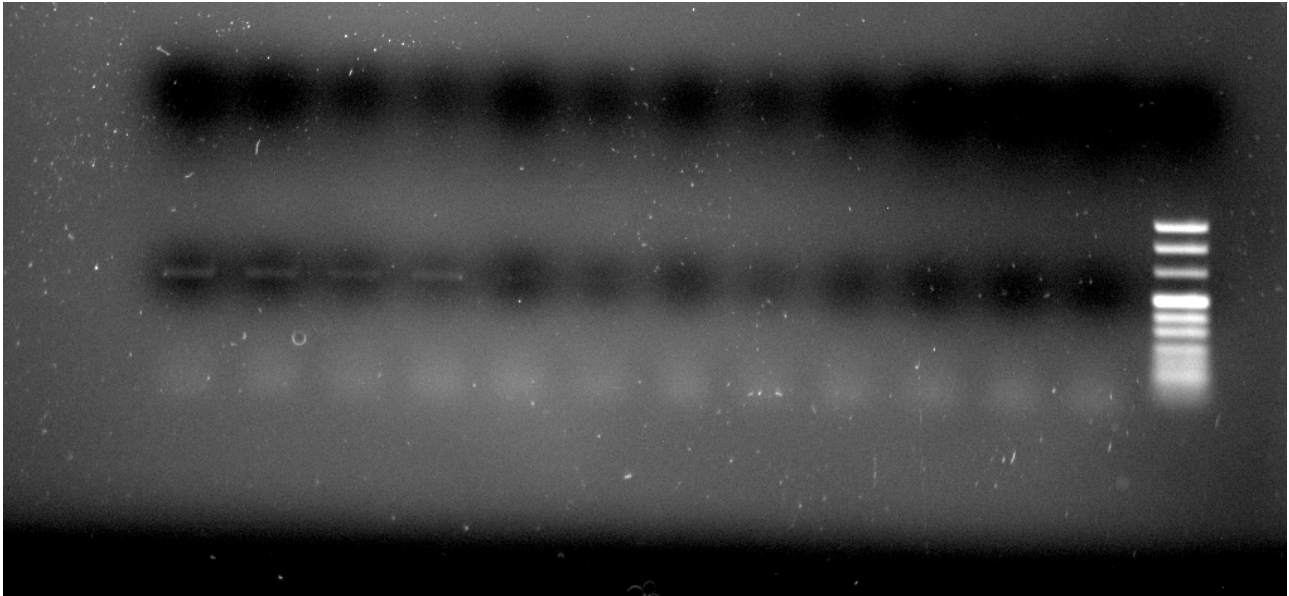
Varsinaiseen PCR-ajoon käytetyn reaktioliuoksen ainesosat on esitetty taulukossa 6. Lämpötilagradientissa sekä 10 että 20 nanogramman reaktioliuokset toimivat hyvin, joten varsinaisten PCR-ajojen DNA-konsentraatio pyrittiin optimoimaan Qubit-tuloksen mukaan niin, että PCR-templaattina oli 10–20 nanogrammaa DNA:ta.

Taulukko 6 PCR-reaktioliuoksen ainesosat

Ainesosa	Määrä (<i>aarF</i> , <i>dfp</i> , <i>galR</i> , <i>glnS</i> , <i>hemA</i> , <i>speA</i>)	Määrä (<i>rfaE</i>)
Mastermix	25 µl	25 µl
Alukkeet (2 µM)	5 µl	15 µl
DNA (20-80 ng/µl)	10-20 ng (0,25-0,5 µl)	20-40 ng (0,5-1,0 µl)
Steriili vesi	19,5-19,8 µl	9,0-9,5 µl
V _{tot}	50 µl	50 µl

Geenin *rfaE* monistaminen ei lämpötilagradientissa onnistunut 10 tai 20 ng:lla. Havaitsimme lämpötiloilla 50-51,8 °C vain pientä monistumista, ja muilla lämpötiloilla monistumista ei havaittu ollenkaan (Kuva 1). Geelielektroforeesikuvasta päättelimme, että epäonnistunut monistus johtuisi liian pienestä määrästä DNA:ta, sillä kuvassa oli havaittavissa käyttämättömiä alukkeita. Näin ollen

reaktioliuoksen DNA-määrä nostettiin 20-40 nanogrammaan. Määrän nostaminen ei kuitenkaan parantanut PCR-ajon tulosta merkittävästi. Näin ollen lisäsimme reaktioon myös suuremman määrän alukkeita (0,3 μ M). Suuremmalla määrällä DNA:ta ja alukkeita saimme lopulta tarpeeksi monistunutta DNA:ta sekvensointiin.



Kuva 1 *rfaE*-geenin ensimmäinen gradientti. Gradientissä käytetty kantaa 8. Lämpötilat vasemmalta oikealle 50-61, molekyylipainomarker uloimpana oikealla

Varsinaiseen PCR-ajoon käytettiin samaa PCR-ohjelmaa kuin lämpötilagradienttiin (Taulukko 4). Alukkeiden kiinnittymislämpötila oli alukeriippuvainen (Taulukko 3). PCR-ohjelman vaiheet 2-4 toistettiin 30 syklin verran. PCR-ajoissa oli mukana negatiivinen kontrolli, jossa DNA-suspension määrä korvattiin steriilillä vedellä. Koska meillä oli ongelmia *rfaE*-geenin monistumisen kanssa, ajoimme tämän geenin PCR-ajossa monistussyklejä (vaiheet 2-4) 35 kappaletta. Loppujäähdytyksen aika vaihteli 5-15 minuutin välillä. Jäähdytyksen jälkeen näytteet pakastettiin, jos geelielektroforeesia tuotteen laadun varmistamiseksi ei suoritettu samana päivänä.

PCR-tuotteen pitoisuus varmistettiin Qubit-menetelmällä, ja laatu Nanodrop-menetelmällä. Käytimme samoja raja-arvoja kuin DNA-eristyksen kohdalla. Hyvälaatuiset PCR-tuotteet ajettiin 1,0 % TAE-geelissä (Taulukko 5) samalla elektroforeesiohjelmalla kuin lämpötilagradienttivaiheessa varmistaaksemme, että tuote sisälsi oikeankokoisen DNA-fragmentin.

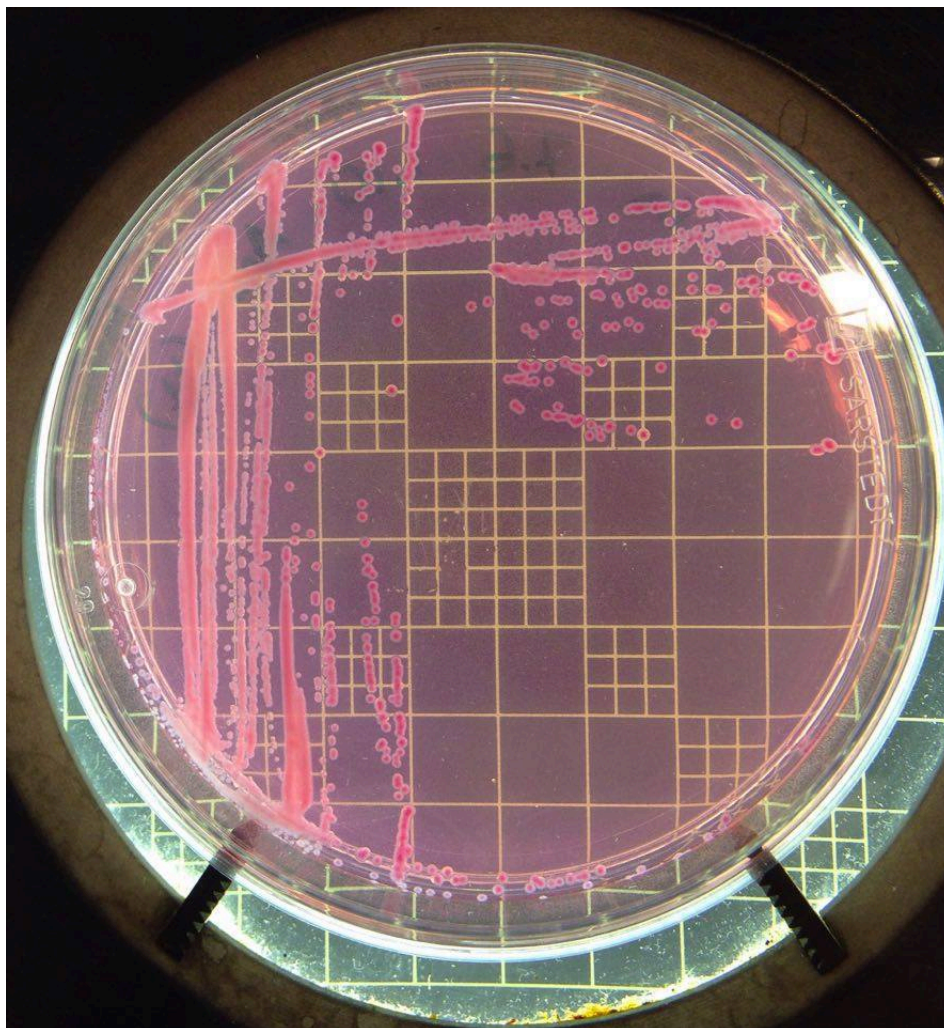
PCR-tuotteet lähetettiin Helsingin Yliopiston Biotekniikan instituuttiin sekvensoitavaksi kahteen suuntaan. Tuotteet puhdistettiin Millipore MultiScreen PCR 96-menetelmällä (Merck Millipore,

Darmstadt, Saksa). Sekvensointiin käytettiin Applied Biosystems'in BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit- sarjaa (Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, USA), ja sekvensointi suoritettiin Applied Biosystems ABI3730 DNA Analyzer (48-capillaries) - koneistolla (Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, USA). Reaktioiden puhdistukseen käytettiin Agencourt CleanSEQ- sarjaa (Becman Coulter, Indianapolis, USA).

Saadut sekvenssit analysoitiin Mega 6.0-ohjelmalla (Tamura ym. 2013). Sekvenssit linjattiin Clustal W –algoritmillä, sekvenssejä verrattiin vastinjuosteidensa sekvensseihin ja muokattiin halutuiksi pituuksiksi. Eri kantojen sekvenssejä verrattiin myös keskenään, jotta havaitsimme mahdolliset erot sekvenssien välillä. Saadut sekvenssit syötettiin julkiseen MLST-tietokantaan (<http://pubmlst.org/yersinia/>), joka tunnisti sekvenssistä geenin alku- ja loppukohdan ja vertasi geenejä tietokannan materiaaliin. Näin jokaiselle saadulle sekvenssille saatiin alleelinumero, joiden perusteella voitiin laatia jokaiselle geenille oma sekvenssityyppi.

6. TULOKSET

Kaikki kannat kasvoivat sekä veri- että CIN-maljoilla yersinioille hyvin tyypillisellä tavalla. CIN-agarilla pesäkkeet olivat noin 1,0 mm halkaisijaltaan, häränsilmän halkaisija oli noin 0,6 mm (Kuva 2). Kannoilla 3 ja 5 pesäkkeet olivat keskimääräistä suurempia (1,3-1,5 mm), ja huomattavasti kosteampia kuin muiden kantojen pesäkkeet.



Kuva 2 CIN-agarilla kasvava *Y. enterocolitica*, kanta 10 (LAS 416), yksi pieni ruutu 1 mm x 1 mm

Kaikki tutkimuksen kannat kantaa 3 (SWHY 119) lukuun ottamatta tunnistettiin *Y. enterocolitica* bioserotyypiksi 2/O:9. Kolme kantaa (1, 2 ja 5) antoi heikosti positiivisen serotyyppitustuloksen myös muille seroryhmille, mutta koska kannat oli aikaisemmin todettu O:9-serotyypin kannoiksi, luokittelimme ne bioserotyyppiin 2/O:9. Kanta kolme osoittautui biotyyppityksen perusteella lähemmäksi bioserotyyppiä 1A/O:5. Kantojen biotyyppitustulokset löytyvät taulukosta 7 ja serotyyppitustulokset taulukosta 8.

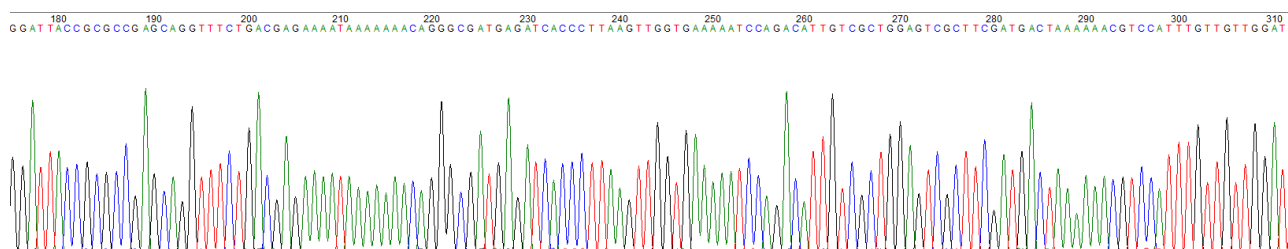
Taulukko 7 *Y. enterocolitica* –kantojen tunnistus ja biotyypitys

Kanta										
Testi	1 (HVE3891)	2 (JHI 111222)	3 (SWHY 119)	4 (SWT 207)	5 (MYM2 9A17)	6 (WSTY 128)	7 (LAS 380)	8 (LAS 395)	9 (LAS 412)	10 (LAS 416)
Api 20E	1155723--	1155723--	1155723--	1155723--	1155723--	1155723--	1155723--	1155723--	1155723--	1155723--
Indoli-tuotto	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehaloosi (hapontuotto)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ksyyloosi (hapontuotto)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salisiini (hapontuotto)	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Eskuliini- hydrolyysi	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
Tween- esteraasi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyraatsinami- daasi	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
Biotyyppi:	2	2	1A	2	2	2	2	2	2	2

Taulukko 8 Tutkittujen kantojen serotyyppitys

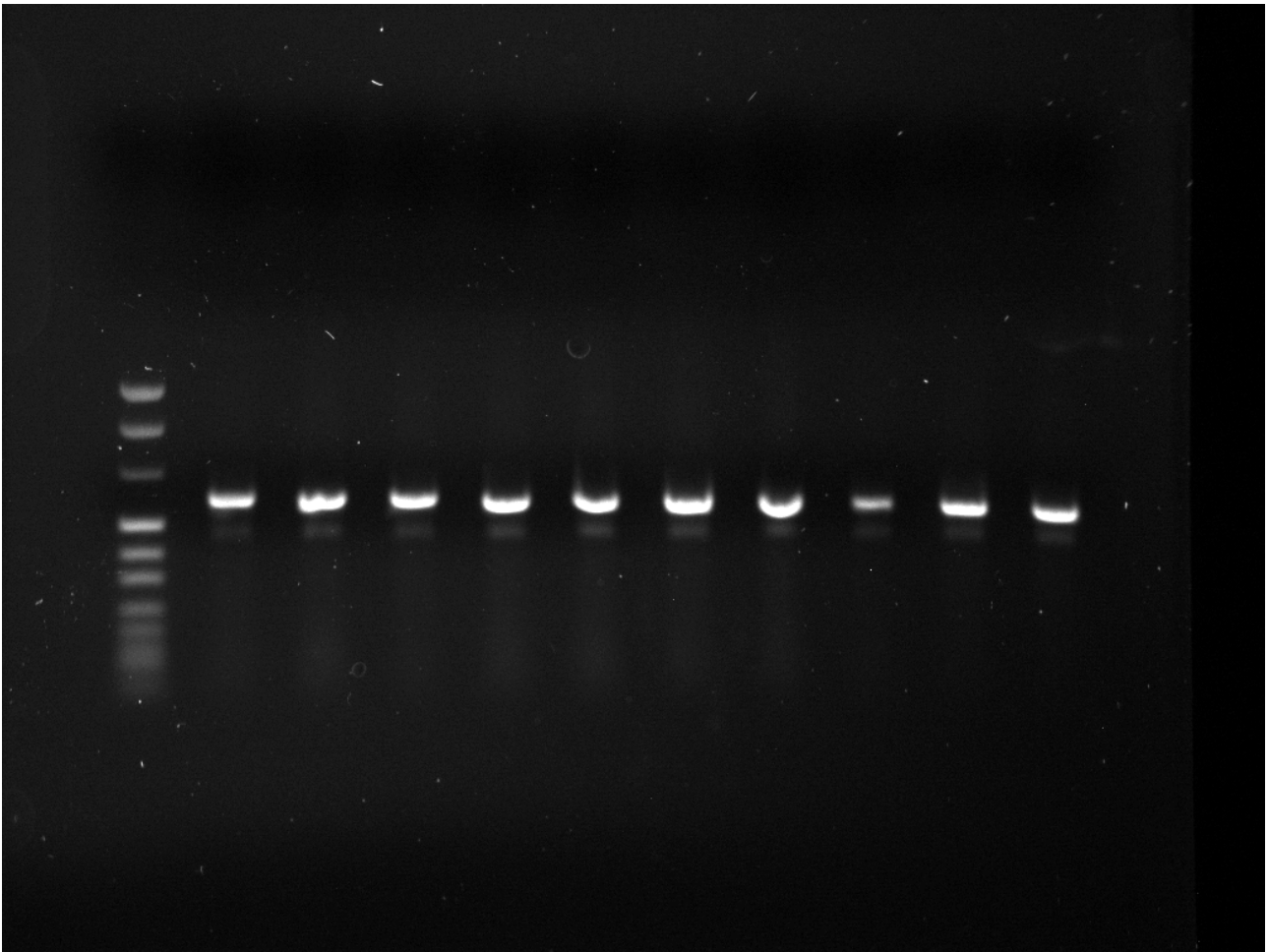
Serotyyppi	Kannat									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
O:1/O:2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O:3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O:5	+/-	+/-	+	-	+/-	-	-	-	-	-
O:8	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
O:9	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Tislattu vesi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Saamamme sekvenssidata oli yleisesti hyvälaatuista (Kuva 3). Materiaali osoittautui varsin homogeeniseksi, ja vaihtelut kohdistuivat vain pariin geeniin. Poikkeuksena kanta 3 (SWHY 119), joka erosikin myös bioserotyypiltään muista tutkituista kannoista. Bioserotyypin 2/O:9 sisäiset vaihtelut tapahtuivat geneeissä *hemA* ja *rfaE*.

**Kuva 3** Osa *dfp*-sekvenssistä kannasta 10 (LAS 416), 5'→3'

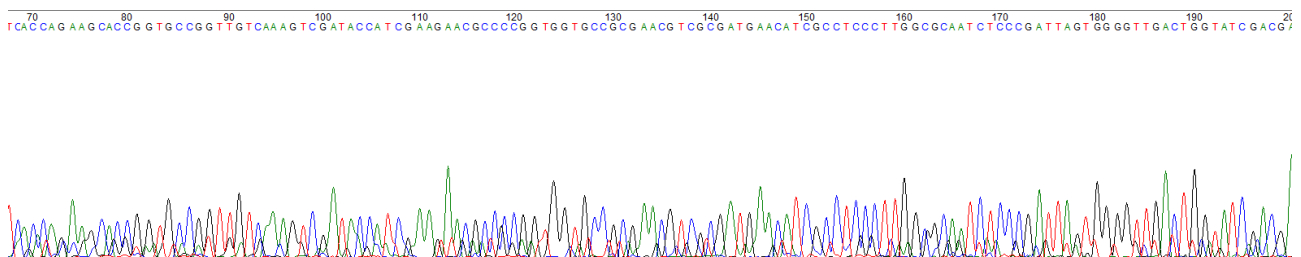
Geenin *speA* PCR-ajossa oli ongelmia. Kun tuotteet ajettiin elektroforeesissa, ajossa ajautui erilleen selvä ylimääräinen juoste (kuva 4). Kyseisen juosteen voimakkuus oli selvästi heikompi kuin varsinaisen, halutun juosteen voimakkuus. Epäilimme, että ylimääräinen juoste voisi olla väärin monistuneita geenifragmentteja tai yksinkertaisia kopioita toisesta juosteesta. Yksijuosteiset geenifragmentit ovat kevyempiä kuin kaksijuosteiset, mikä selittäisi sen, miksi ylimääräinen oli hieman varsinaista juostetta pidemmällä.

Toistimme geenin *speA* PCR-ajon useampaan kertaan vähentämällä DNA:n pitoisuutta ja lisäämällä alukkeiden pitoisuutta. Muutokset reaktioliuokseen eivät poistaneet ylimääräistä juostetta elektroforeesikuvasta. Näin ollen päätimme lähettää alkuperäiset PCR-tuotteet sekvensoitavaksi. Sekvensointi onnistui ylimääräisestä juosteesta huolimatta yksiselitteisesti ja laadukkaasti, joten saatu sekvenssi oli käyttökelpoista.



Kuva 4 *speA*-geenin PCR-ajo. Kannat 1-10 vasemmalta oikealle, molekyylipainomarker ulommaisena vasemmalla.

Myös geenin *rfaE* PCR-ajon kanssa oli ongelmia, ja PCR-ajon muutoksista huolimatta näytteistä saatiin hyvin huonolaatuista sekvenssiä (Kuva 5). Data sisälsi paljon tuplahuippuja eikä saatu sekvenssi ollut yksiselitteistä. Lisäksi toisen juosteen sekvensointi (suuntaan 3'→5') ei onnistunut laisinkaan, joten eri suuntiin sekvensoituja juosteita ei voinut verrata keskenään. Näin ollen saadut *rfaE* tulokset olivat hyvin epäluotettavia.



Kuva 5 *rfaE*-sekvenssi kannasta 10 (LAS 416), 5'→3

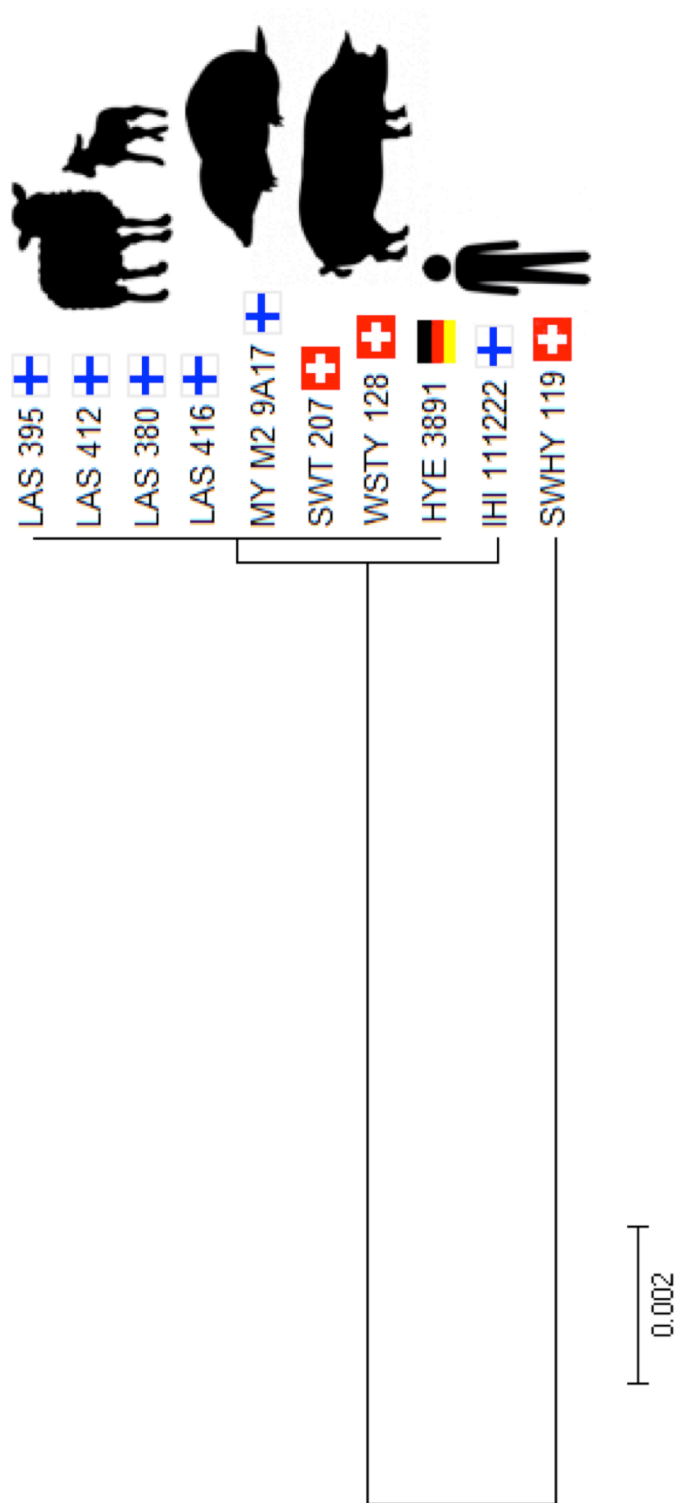
Lähes kaikkien kantojen sekvenssityypit osoittautuivat identtiseksi. Kaikki eristetyt sekvenssit löytyivät jo ennestään MLST-tietokannasta. Kantojen sekvenssityypit on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 9 Tutkittujen kantojen MLST-profiilit

Kanta	Geeni							Sekvenssi- tyyppi	Eristys -maa	Lähde
	<i>aarF</i>	<i>dfp</i>	<i>galR</i>	<i>glnS</i>	<i>hemA</i>	<i>speA</i>	<i>rfaE</i>			
1	3	2	3	3	2	3	3	12	Saksa	Ihminen
2	3	2	3	3	6	3	3	14	Suomi	Ihminen
3	2	4	2	2	7	2	2	3	Sveitsi	Ihminen
4	3	2	3	3	2	3	3	12	Sveitsi	Sika
5	3	2	3	3	2	3	12	145	Suomi	Myyrä
6	3	2	3	3	2	3	3	12	Sveitsi	Villisika
7	3	2	3	3	2	3	3	12	Suomi	Lammas
8	3	2	3	3	2	3	3	12	Suomi	Lammas
9	3	2	3	3	2	3	3	12	Suomi	Lammas
10	3	2	3	3	2	3	3	12	Suomi	Lammas

Kaikki Suomesta eristetyt lammaskannat vastasivat toisiaan. Lisäksi Sveitsistä eristetyt sika- ja villisikakannat olivat samaa tyyppiä kuin lammaskannat. Ihmiskantojen välillä oli suurin vaihtelevuus.

Saaduista sekvenssityypeistä laadittiin fylogeneettinen puu, jonka avulla esitettiin tutkittujen kantojen suhteet toisiinsa. Tarkastelusta jätettiin pois *rfaE*-geenin tulokset niiden epäluotettavuuden vuoksi. Puu on esitetty kuvassa 6.



Kuva 6 Tutkittujen kantojen väliset suhteet. Tarkastelussa ei otettu huomioon *rfaE*-geenin tuloksia

7. POHDINTA

Viime vuosina Euroopassa on huomattu *Y. enterocolitica* bioserotyyppin 2/O:9 esiintyvyyden kasvu. *Y. enterocolitica* on Euroopan kolmanneksi yleisin raportoitu zoonoosi (EFSA & ECDC 2015) ja näin ollen on tärkeää tutkia bakteerin leviämistä Euroopassa taudinpurkauksien ehkäisemiseksi. Tutkimuksessa halusimme selvittää kyseisen bioserotyyppin sisäisiä eroavaisuuksia ja näin ollen selvittää bakteerin leviämisreittejä ja mahdollisia reservuaareja. Lisäksi tarkoituksena oli pystyttää Elintarvikehygienian- ja ympäristöterveyden osastolle toimiva, *Y. enterocolitica* 2/O:9 kannoille toimiva MLST-menetelmä, joka perustuu seitsemän ylläpitogeenin (housekeeping geenit) sekvenssien eroihin (Hall ym. 2015).

Villieläinten on aikaisemmin epäilty olevan *Y. enterocolitica* bioserotyyppin 2/O:9 reservoaari. Ranskassa tehdyssä tutkimuksessa eristettiin bioserotyyppiä kotieläinten laidunruohosta, mikä viittaa siihen, että joko villi- tai kotieläimet olisivat voineet kontaminoida ympäristön ulosteellaan (Le Guern ym. 2016). Näin kontaminoitunut ympäristö voisi toimia tartuntareittinä kotieläinten ja villieläinten välillä. Tutkimuksemme vahvistaa ajatusta reservuaarista edelleen, sillä suomalaisesta myyrästä eristetty kanta vastasi suomalaisten kotieläinten kantoja. Kuitenkin myös Sveitsistä eristetyt kannat olivat identtisiä suomalaisten lammaskantojen kanssa, mikä voi viitata siihen, että kyseisellä bioserotyyppillä ei näiden ylläpitogeenien kohdalla esiinny juurikaan vaihtelua.

Ihmiskantojen välillä esiintyi vaihtelevuutta MLST-tyypeissä. Yksi ihmisistä eristetyistä näytteistä osoittautui eri bioserotyyppiksi kuin muut kannat. Suomalaisen ihmisen ulosteesta eristetty kanta poikkesi muista 2/O:9-kannoista useamman geenin kohdalta. On mahdotonta tietää, onko kyseinen ihminen saanut bakteeritartunnan Suomessa vai kenties matkoilla, Euroopassa tai sen ulkopuolella. Näin ollen ei voida sanoa, onko poikkeava kanta todiste Euroopan sisäisistä bakteerikantojen vaihteluista, vai kertooko se maailmanlaajuisista vaihteluista. Bioserotyyppiä tulisi eristää useammasta sijainnista asian selvittämiseksi.

MLST-menetelmän pystyttäminen osastolla osoittautui varsin yksinkertaiseksi. Pääosin saamamme tulokset olivat yksiselitteisiä ja alukkeet toimivat onnistuneesti laajalla lämpötila-alueella. Vaikka *speA*-geenin kohdalla esiintyi varsinaista juostetta heikompi haamujuoste, ei se vaikuttanut lopulliseen sekvenssitulokseen. Sekvenssi oli laadukasta ja yksiselitteistä. On mahdollista, että ylimääräinen juoste sisälsi haluttua geeniä, mutta vastinjuosteet olivat jostain syystä eronneet

toisistaan. Yksijuosteinen DNA-juoste on kevyempi kuin kaksijuosteinen, jolloin se etenisi pidemmälle elektroforeesissa.

Yksinkertaisuudesta poikkeuksena oli *rfaE*-geeni, jonka alukkeet eivät toimineet odotetusti. Muokkasimme geenin osalta protokollaa useaan otteeseen, mutta sekvenssien laatu ei parantunut. Näin ollen tulevaisuudessa, jos menetelmä halutaan rutiinikäyttöön, vaatii *rfaE*-geenin käyttöönotto vielä muokkausta. Tutkituista geeneistä *rfaE*-geenin sekvenssi osoittautui varsin huonolaatuiseksi. Näin ollen tutkittujen kantojen *rfaE*-geeni tulisi sekvensoida uudelleen saatujen sekvenssityyppien varmistamiseksi. Varsinkin kanta 5 (MYM2 9A17) poikkesi lammaskannoista vain parin emäksen kohdalta. Näin ollen jää epäselväksi, voisivatko ne silti kuulua samaan sekvenssityyppiin.

Saimme serotyyppityksessä runsaasti ristireaktioita. Kannat 1,2 ja 5 antoivat usean serotyypin kohdalla positiivisen tuloksen. Kannat oli aikaisemmin todettu serotyyppiksi O:9, joten on mahdollista, että agglutinaatiotesti on testaushetkellä tulkittu väärin. Lisäksi monet yersiniakannat kasvavat mielellään hyvin läheisessä kontaktissa muiden kantojen kanssa, joten jos näytteessä esiintyi kahta erilaista yersiniakantaa, voi se vaikuttaa serotyyppitykseen. Koska kannat oli aiemmin todettu O:9-positiiviseksi, päädyimme lopulta samaan lopputulokseen.

Lopulta lähes kaikki tutkimuksen kannat osoittautuivat hyvin samankaltaisiksi. Koska hyvin erilaisista lähteistä ja kaukaa toisistaan eristetyt kannat olivat hyvin samankaltaisia, on vaikea sanoa, onko kyseiseen MLST- menetelmään valittujen geenien variaatio liian pientä erottamaan bakteerin bioserotyypin sisäiset eroavaisuudet. Kuitenkin eri bioserotyypin edustaja, kanta 3, erosi muista kannoista huomattavasti. Tämä viittaisi siihen, että MLST-menetelmällä pystyisi erottelemaan *Y. enterocolitica*n eri bioserotyypit toisistaan luotettavasti. Lisäksi kanta 3 oli biotyyppiä 1A, mikä on *Y. enterocolitica*n biotyypeistä nonpatogeeninen, ja näin ollen menetelmän avulla pystyimme erottelemaan selkeästi patogeeniset kannat nonpatogeenisistä.

Suurin osa yersinioiden MLST-tietokannassa sijaitsevista serotyypin O:9-kannoista ovat täysin identtistä saamamme sekvenssityypin 12 kanssa. Tämä vahvistaa tutkimuksemme tulosten luotettavuutta. Kuitenkin tietokannassa on serotyypin O:9 osalta vain kantoja Iso-Britanniasta, minkä vuoksi serotyypin sisäisten vaihteluiden selvittämiseksi tarvittaisiin huomattavasti enemmän kantoja useammasta sijainnista. Suppean kantamäärän vuoksi on mahdotonta sanoa, johtuuko kantojen samankaltaisuus vaihtelun puutteesta bioserotyypin sisällä vai epäonnistuneesta ylläpitogeenien valinnasta.

Kaiken kaikkiaan tutkimus antoi arvokasta tietoa MLST-menetelmän toiminnasta *Y. enterocolitica* -bakteerin kohdalla. Muokattu, toimiva protokolla mahdollistaa myös tulevat tutkimukset aiheesta, joiden avulla voidaan selvittää bioserotyypin 2/O:9 monimuotoisuutta edelleen.

8. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksemme yksi tärkeimmistä tavoitteista oli pystyttää *Y. enterocolica* –bakteerille toimiva MLST-menetelmä. Menetelmän pystyttäminen onnistui yleisesti hyvin. Ainoastaan *rfaE*-geenin kohdalla PCR-ajon optimointi ei onnistunut, minkä vuoksi sekvenssitulokset jäivät heikoiksi.

Tutkimuksemme kannoista yhdeksän *Y. enterocolitica* –kantaan varmistettiin bioserotyypiksi 2/O:9. Yksi kanta osoittautui bioserotyypiksi 1A/O:5.

Kaikkien bioserotyyppin 2/O:9 kantojen MLST-sekvenssityypit muistuttivat läheisesti toisiaan, mutta poikkesivat selkeästi bioserotyyppin 1A/O:5 –kannasta. Bioserotyyppin 2/O:9 kantojen sisällä sekvenssimuutoksia esiintyi ainoastaan *speA* ja *rfaE* –geneissä.

9. KIITOKSET

Haluan ensisijaisesti kiittää ohjaajaani Suvi Joutsenen kärsivällisestä ja omistautuneesta ohjauksesta, jonka vuoksi tiesin aina saavani apua tarvittaessa. Lisäksi suuri kiitos käytännön avusta Maria Starkille ja Riikka Laukkanen-Niniokselle. Erityiskiitokset myös työn johtajalle professori Maria Fredriksson-Ahomaalle innostavasta tuesta ja perehdytyksestä yersinioiden maailmaan. Haluan kiittää Maa- ja metsätalousministeriötä (999/311/2013) sekä Walter Ehrströmin säätiötä tutkimukseni rahoittamisesta. Lopuksi haluan kiittää muita kesäkoululaisia ja erityisesti Veera Karhapäää korvaamattomasta vertaistuesta ja vinkeistä kirjallisen työn suhteen opponoinnissa.

10. LÄHTEET

- Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 1999, 96: 14043-14048.
- Allaoui A, Woestyn S, Sluiter C, Cornelis GR. YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. J Bacteriol 1994, 176: 4534-4542.
- Balakrishna K, Murali H, Batra H. Cloning, expression and characterization of attachment-invasion locus protein (Ail) of *Yersinia enterocolitica* and its utilization in rapid detection by immunoassays. Lett Appl Microbiol 2010, 50: 131-137.
- Bhagat N, Viridi JS. The enigma of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A. Crit Rev Microbiol 2011, 37: 25-39.
- Black RE, Jackson RJ, Tsai T, Medvesky M, Shayegani M, Feeley JC, MacLeod KI, Wakelee AM. Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. N Engl J Med 1978, 298: 76-79.
- Bolin I, Norlander L, Wolf-Watz H. Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. Infect Immun 1982, 37: 506-512.
- Bonardi S, Bassi L, Brindani F, D'Incau M, Barco L, Carra E, Pongolini S. Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy. Int J Food Microbiol 2013, 163: 248-257.
- Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. Microb Infect 1999, 1: 323-333.
- Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: Revisitation of an Enduring Human Pathogen. Clin Microbiol Newsl 2015, 37: 1-8.
- Bozcal E, Uzel A, Aydemir S, Skurnik M. Isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains from different sources in Izmir region, Turkey. Folia Microbiol (Praha) 2015, 60: 523-529.
- Campioni F, Falcão JP. Genotypic diversity and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from clinical and non-clinical origins. APMIS 2014, 122: 215-222.
- Carniel E, Guilvout I, Prentice M. Characterization of a large chromosomal 'high-pathogenicity island' in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. J Bacteriol 1996, 178: 6743-6751.
- Carniel E, Authenrieth I, Cornelis G, Fukushima H, Guinet F, Isberg R, Pham J, Prentice M, Simonet M, Skurnik M, Wauters G. chapter 3.3.13, *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. Teoksessa: Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, Erko Stackebrandt (toim.) The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria. 3 p. Springer Science Business Media, LLC, 2006: 270-398.
- Chan MS, Maiden MC, Spratt BG. Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. Bioinformatics 2001, 17: 1077-1083.
- Chenais E, Bagge E, Lambert ST, Artursson K. *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 cultured from Swedish sheep showing serologically false-positive reactions for *Brucella melitensis*. Infect Ecol Epidemiol 2012, 2.1: 19027

Chung LK, Bliska JB. *Yersinia* versus host immunity: how a pathogen evades or triggers a protective response. *Curr Opin Microbiol* 2016, 29: 56-62.

Cornelis G, Sluiter C, de Rouvroit CL, Michiels T. Homology between virF, the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon, and AraC, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator. *J Bacteriol* 1989, 171: 254-262.

Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, Sory MP, Stainier I. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, 62: 1315-1352.

Duan, R., Liang, J., Shi, G., Cui, Z., Hai, R., Wang, P. & Du, X. Homology analysis of pathogenic *Yersinia* species *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia pestis* based on multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2014, 52: 20-29.

EFSA. Scientific Opinion of the Panel on BIOHAZ on a request from EFSA on monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia spp.* The EFSA J 2007, 595: 1-30.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA J 2015, 13:4329.

El Tahir Y, Skurnik M. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *IntJ Med Microbiol* 2001, 291: 209-218.

Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* 1999, 7: 482-487.

Fredriksson-Ahomaa M, Korte T, Korkeala H. Transmission of *Yersinia enterocolitica* 4/O: 3 to pets via contaminated pork. *Lett Appl Microbiol* 2001, 32: 375-378.

Fredriksson-Ahomaa M, Cernela N, Hächler H, Stephan R. *Yersinia enterocolitica* strains associated with human infections in Switzerland 2001–2010. *Eur J Clinical Microbiol Infect Dis* 2012, 31: 1543-1550.

Fredriksson-Ahomaa M, Korte T, Korkeala H. Contamination of carcasses, offals, and the environment with yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in a pig slaughterhouse. *J Food Prot* 2000, 63: 31-35.

Fredriksson-Ahomaa M, Wacheck S, Koenig M, Stolle A, Stephan R. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in Switzerland. *Int J Food Microbiol* 2009, 135: 199-202.

Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Stephan R. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. *Int J Food Microbiol* 2007, 119: 207-212.

Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Korkeala H. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006, 47: 315-329.

Glaeser SP, Kämpfer P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst Appl Microbiol* 2015, 38: 237-245.

Gripenberg-Lerche C, Skurnik M, Toivanen P. Role of YadA-mediated collagen binding in arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: experimental studies with rats. *Infect Immun* 1995, 63: 3222-3226.

Guinet F, Carniel E, Leclercq A. Transfusion-transmitted *Yersinia enterocolitica* sepsis. *Clin Infect Dis* 2011, 53: 583-591.

- Hall M, Chattaway MA, Reuter S, Savin C, Strauch E, Carniel E, Connor T, Van Damme I, Rajakaruna L, Rajendram D, Jenkins C, Thomson NR, McNally A. Use of whole-genus genome sequence data to develop a multilocus sequence typing tool that accurately identifies *Yersinia* isolates to the species and subspecies levels. *J Clin Microbiol* 2015, 53: 35-42.
- Howard SL, Gaunt MW, Hinds J, Witney AA, Stabler R, Wren BW. Application of comparative phylogenomics to study the evolution of *Yersinia enterocolitica* and to identify genetic differences relating to pathogenicity. *J Bacteriol* 2006, 188: 3645-3653.
- Jaakola S, Lyytikäinen O, Rimhanen-Finne R, Salmenlinna S, Pirhonen J, Savolainen-Kopra C, Liitsola K, Jalava J, Toropainen M, Nohynek H, Virtanen M, Löflund JE, Kuusi M, Salminen M. Tartuntataudit Suomessa 2015. THL Raportti 2016_010.
- Joutsen, S, Eklund, K M, Laukkanen-Ninios, R, Stephan, R, & Fredriksson-Ahomaa, M. Sheep carrying pathogenic *Yersinia enterocolitica* bioserotypes 2/O:9 and 5/O:3 in the feces at slaughter. *Vet Microbiol* 2016, 197: 78-82.
- Kapatral V, Olson JW, Pepe JC, Miller VL, Minnich SA. Temperature-dependent regulation of *Yersinia enterocolitica* class III flagellar genes. *Mol Microbiol* 1996, 19: 1061-1071.
- Korte T, Fredriksson-Ahomaa M, Niskanen T, Korkeala H. Low prevalence of yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in sows. *Foodborne Pathog Dis* 2004, 1: 45-52.
- Kotetishvili M, Kreger A, Wauters G, Morris JG, Jr, Sulakvelidze A, Stine OC. Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. *J Clin Microbiol* 2005, 43: 2674-2684.
- Le Guern A, Martin L, Savin C, Carniel E. Yersiniosis in France: overview and potential sources of infection. *Int J Infect Dis* 2016, 46: 1-7.
- MacDonald E, Heier B, Stalheim T, Cudjoe K, Skjerdal T, Wester A, Lindstedt B, Vold L. *Yersinia enterocolitica* O:9 infections associated with bagged salad mix in Norway, February to April 2011. *Euro Surveill* 2011, 16.19
- Maiden MCJ, Van Rensburg MJJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, McCarthy ND. MLST revisited: The gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol* 2013, 11: 728-736.
- Mikula KM, Kolodziejczyk R, Goldman A. *Yersinia* infection tools-characterization of structure and function of adhesins. *Front Cell Infect Microbiol* 2012, 2
- Neubauer H, Aleksic S, Hensel A, Finke E, Meyer H. *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. *Int J Med Microbiol* 2000, 290: 61-64.
- Okwori AE, Ortiz Martínez P, Fredriksson-Ahomaa M, Agina SE, Korkeala H. Pathogenic *Yersinia enterocolitica* 2/O:9 and *Yersinia pseudotuberculosis* 1/O:1 strains isolated from human and non-human sources in the Plateau State of Nigeria. *Food Microbiol* 2009, 26: 872-875.
- Ortiz Martinez P, Fredriksson-Ahomaa M, Pallotti A, Rosmini R, Houf K, Korkeala H. Variation in the prevalence of enteropathogenic *Yersinia* in slaughter pigs from Belgium, Italy, and Spain. *Foodborne Pathog Dis* 2011, 8: 445-450.
- Ortiz Martínez P, Mylona S, Drake I, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H, Corry JE. Wide variety of bioserotypes of enteropathogenic *Yersinia* in tonsils of English pigs at slaughter. *Int J Food Microbiol* 2010, 139: 64-69.

- Ostroff S, Kapperud G, Hutwagner L, Nesbakken T, Bean N, Lassen J, Tauxe R. Sources of sporadic *Yersinia enterocolitica* infections in Norway: a prospective case-control study. *Epidemiol Infect* 1994, 112: 133-141.
- Petersen JM, Gladney LM, Schrieffer ME. *Yersinia*. Teoksessa: Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition. American Society of Microbiology, 2015
- Pilon J, Higgins R, Quessy S. Epidemiological study of *Yersinia enterocolitica* in swine herds in Quebec. *Can Vet J* 2000, 41: 383-387.
- Rahikainen Ibañez T, Laukkanen-Ninios R, Hakkinen M, Johansson T, Vilar M, Korkeala H. Prevalence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Finnish slaughter pigs. *J Food Prot* 2016, 79: 677-681.
- Rakin A, Noelting C, Schubert S, Heesemann J. Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1999, 67: 5265-5274.
- Ramamurthy T, Yoshino K, Huang X, Nair GB, Carniel E, Maruyama T, Fukushima H, Takeda T. The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (ystB) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the yst genes. *Microb Pathog* 1997, 23: 189-200.
- Revell PA, Miller VL. *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiol Lett* 2001, 205: 159-164.
- Rosner BM, Stark K, Werber D. Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008. *BMC Public Health* 2010, 10: 1.
- Rouvroit CL, Sluiter C, Cornelis G. Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 1992, 6: 395-409.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, 74: 5463-5467.
- Schleifstein J, Coleman M. An Unidentified Microorganism resembling *B. lignieri* and *Past. pseudotuberculosis*, and pathogenic for Man. *N Y State J Med* 1939, 39: 1749-1753.
- Sihvonen LM, Hallanvuo S, Haukka K, Skurnik M, Siitonen A. The *ail* gene is present in some *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains. *Foodborne Pathog Dis* 2011, 8: 455-457.
- Sihvonen, L. M., Jalkanen, K., Huovinen, E., Toivonen, S., Corander, J., Kuusi, M., Skurnik, M., Siitonen, A. ja Haukka, K. Clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A represent two phylogenetic lineages with differing pathogenicity-related properties. *BMC Microbiol* 2012 12: 1.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013, 30: 2725-2729.
- Toivanen P, Olkkonen L, Toivanen A, Aantaa S. Hospital Outbreak of *Yersinia enterocolitica* infection. *Lancet* 1973, 301: 801-803.
- Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* 2003, 11: 479-487.
- Vincent AT, Derome N, Boyle B, Culley AI, Charette SJ. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *J Microbiol Methods* 2016

Von Altrock A, Seinige D, Kehrenberg C. *Yersinia enterocolitica* Isolates from Wild Boars Hunted in Lower Saxony, Germany. Appl Environ Microbiol 2015, 81: 4835-4840.

Wojciech Ł, Staroniewicz Z, Jakubczak A, Ugorski M. Typing of *Yersinia enterocolitica* Isolates by ITS Profiling, REP-and ERIC-PCR. J Vet Med, Series B 2004, 51: 238-244.

Liite 1 Tutkimuksessa käytetyt elatusaineet

Naudanveriagar

Ainesosa	Määrä	Valmistaja
Columbian Blood Agar Base No.2	44 g	Oxoid, Basingstoke, UK
H ₂ O	1000 ml	

Agarpohjaa autoklavoitiin 121 °C 50 min. Naudanveri (50 ml) sekoitettiin agariin ennen valamista maljoille.

Urea-putket

1,5 % vesiagar

Ainesosa	Määrä	Valmistaja
European bacteriological agar	15 g	CONDA, Madrid, Espanja
H ₂ O	1000 ml	

Autoklavoidaan 121 °C 15 min.

20 % Urealiuos

Ainesosa	Määrä	Valmistaja
Difco Urea Agar Base	29 g	Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
H ₂ O	100 ml	

Steriilisuodatetaan

Ureaputket

Ainesosa	Määrä	
Vesiagar	90 ml	
Urealiuos	10 ml	

Urea-agar valetaan koeputkiin vinopinnoiksi.

Sokeriputket

Sokerin kantaliuos

Ainesosa	Määrä	Valmistaja
Bacto peptone	10,0 g	BD, Le Point de Claix, Ranska
NaCl	5,0 g	
H ₂ O	1000 ml	

Keitetään kunnes jauheet liuenneet. Autoklavoidaan 121 °C 15 min.

10 % sokeriliuos

Ainesosa	Määrä	Valmistaja
Sokeri (xyl, tre tai sal)	10 g	Merck, Darmstadt, Saksa
H ₂ O		

Liuotetaan sokeri ja steriilisuodatetaan.

Sokeriputket		
Ainesosa	Määrä	Valmistaja
Sokerin kantaliuos	94 ml	Merck, Darmstadt, Saksa
0,32 % bromtymolisini	1 ml	
10 % sokeriliuosta	5 ml	

Steriilisuodatetaan ja jaetaan koeputkiin.

CIN-agar

Ainesosa	Määrä	Valmistaja
Yersinia selective agar base	116 g	Lab M, Lancashire, UK
H ₂ O	2000 ml	

Keitetään kunnes agar-jauhe liukenee. Autoklavoidaan 121 °C. Lisätään Yersinia selective supplement-antibioottisä. Valetaan maljoille.

Eskuliiniagar

Ainesosa	Määrä	Valmistaja
Ravintoagar	28,0 g	Oxoid, Hampshire, UK
Eskuliini	1 g	
H ₂ O	1000 ml	Merck, Darmstadt, Saksa

Eskuliini liuotetaan pieneen vesimäärään vesihautessa, lisätään liuenneeseen agariin, autoklavoidaan 121 °C 15 min.

Tween-agar

Ainesosa	Määrä	Valmistaja
Ravintoagar	28,0 g	Oxoid, Hampshire, UK
Tween 80	10 ml	
H ₂ O	1000 ml	Merck, Hoenbrunn, Saksa

Agaria ja vettä keitetään 0,5 h. Lisätään Tween 80 ja keitetään 5 min. Asetetaan pH 7,4. Autoklavoidaan 121 °C 15 min ja valetaan maljoiksi.

Pyratsinamidaasiputket (pyz)

Ainesosa	Määrä	Valmistaja
Trizma-hydrokloridi	31,52g	Difco, Darmstadt, Saksa
Tryptic soy agar	3,0 g	
Yeast extract	1,0 g	Difco, Darmstadt, Saksa
Pyratsinkarboksamidi	1,0 g	
Tislattu vesi	1000 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, Saksa

Trizma-hydrokloridi sekoitetaan veteen, asetetaan pH 6. Lisätään loput aineet, autoklavoidaan 121 °C 15 min ja valetaan vinopinnoiksi, 5 ml/putki